



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Magali Justina Gómez Usnayo

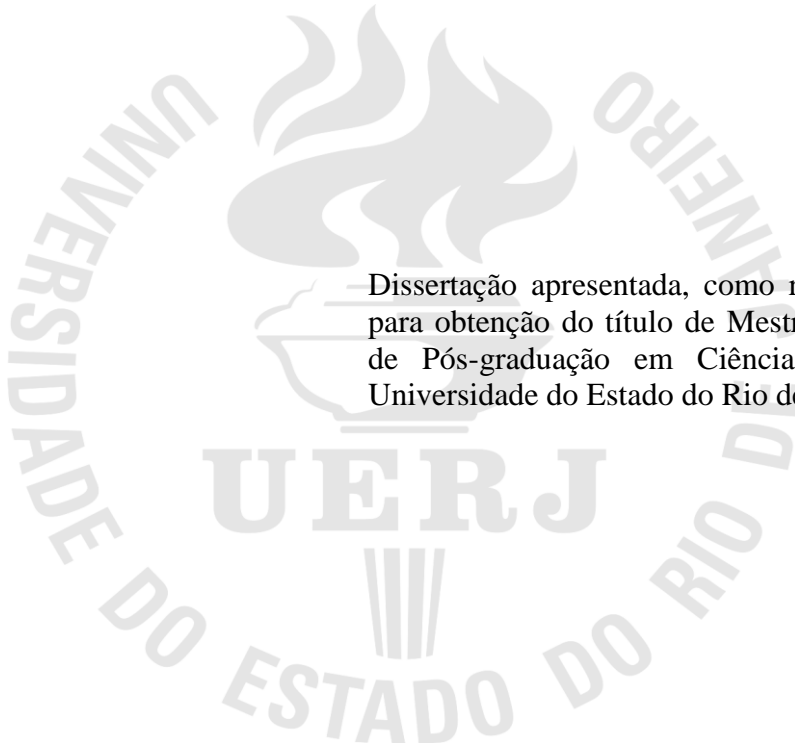
**Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros
com artrite reumatóide**

Rio de Janeiro

2011

Magali Justina Gómez Usnayo

Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com artrite reumatoide



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

U86 Usnayo, Magali Justina Gómez.
Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes
brasileiros com artrite. 2011.
100 f : il.

Orientador: Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro
Coorientador: Luís Cristóvão de Maoraes Sobrino Porto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências
Médicas.

1. Artrite reumatóide – Teses. 2. Antígenos de histocompatibilidade
HLA – Teses. 3. Mapeamento de epitopos. 4. Antígeno HLA-DR1. 5.
Alelos. I. Pinheiro, Geraldo da Rocha Castelar. II. Porto, Luís Cristóvão
de Maoraes Sobrino. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.72-002.77

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Magali Justina Gómez Usnayo

**Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com
artrite reumatoide**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de julho de 2011.

Orientador:

Prof. Dr. Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador:

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Roger Abramino Levy
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^a. Dra. Maria Cecília da Fonseca Salgado
Faculdade de Medicina – UNIRIO

Prof^a. Dra. Sueli Coelho da Silva Carneiro
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^a. Dra. Blanca Elena Rios Gomes Bica
Faculdade de Medicina - UFRJ

Prof. Dr. Evandro Mendes Klumb
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo carinho a meu pai Nicolas Gómez Bacarreza, aos meus irmãos pelo carinho e apoio constante, e a minha mãe Feliza Usnayo Veizán que desde algum lugar perto de Deus está sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecer a Deus pela oportunidade de viver e pelo presente de ter uma família e amigos maravilhosos. Pela força para conseguir terminar este trabalho.

Ao meu orientador e professor Dr. Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro, pelos ensinamentos durante a minha formação como reumatologista e na realização deste projeto, pelo exemplo de pessoa e profissional íntegra, pelo incentivo para seguir me superando na área acadêmica, pelo apoio constante nos momentos mais difíceis da minha vida, pelas palavras alentadoras e de estímulo incondicional, pela confiança depositada.

Ao meu coorientador professor Dr. Luis Cristóvão Porto, pelos ensinamentos, pelo acolhimento no laboratório de HLA, pelo apoio incondicional desde o início da pesquisa.

Aos meus professores do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ, o Dr. Roger A. Levy, Dr. Evandro M. Klumb, Dra. Elisa Albuquerque, Dra. Francinne Machado, Dra. Verônica Vilela, Dra. Renata de Campos Figueiredo e o Dr. Bruno Schau, pelo exemplo de profissionais, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência necessária e por me ensinar e corrigir o português.

Aos meus professores do Hospital Universitário Gaffre Guinle – UNIRIO à Dra. Maria Cecília Salgado e o Dr. João Luiz Pereira Vaz, meus agradecimentos pelo carinho, acolhimento, pelo aprendizado dos primeiros passos na área de reumatologia.

Meus agradecimentos a Juliana Cardoso Oliveira, Gustavo Milson Fabrício da Silva biólogos do laboratório de histocompatibilidade e criopreservação da UERJ e a todos os funcionários do laboratório pelo conhecimento compartilhado.

Ao Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade e a bióloga Renata Triguinho Alarcón do Hospital São Paulo – UNIFESP, pela parceria durante a coleta e entrevista dos pacientes de São Paulo para este projeto.

Ao Dr. Artur Fernandes, pela colaboração e avaliação das radiografias de todos os pacientes, assim como por sua disponibilidade.

Ao Dr. Izidro Bendet Consultor Científico de Imunologia do laboratório Sérgio Franco Medicina Diagnóstica e aos funcionários do laboratório pelo apoio na avaliação dos autoanticorpos.

Agradecimento também mais do que merecido, devo ao Carlos Roberto Gayer, biólogo da Disciplina de Bioquímica, quem me ajudou com os dados estatísticos deste trabalho.

Os meus agradecimentos para a Dra. Ana Beatriz dos Santos Bachiega, Dra. Isabelle D'Oliveira, Dra. Camila Souto, Dra. Ana Beatriz Vargas, pela confiança e apoio incondicional, assim como, pelo auxílio nas dúvidas relacionadas à língua portuguesa e revisão deste trabalho.

Aos pacientes com AR e ao grupo de doadores voluntários que aceitaram participar incondicionalmente desde estudo, agradecer a confiança em mim depositada.

Agradecer também ao meu pai Nicolas, a minha mãe Feliza (In memoriam), e irmãos Zimmer, Roxana, Dagma, Lizbeth e Edil, pelo carinho, compreensão, apoio incondicional e constante em todo momento. Muito obrigada.

A todos os meus amigos e amigas que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto.

Não tenha medo do sofrimento, pois nenhum coração jamais sofreu quando foi em busca dos seus sonhos.

Paulo Coelho

RESUMO

GÓMEZ USNAYO, Magali Justina. *Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com artrite*. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Os alelos HLA-DRB1, que codificam uma sequência de aminoácidos (QKRAA/QRRAA/RRRAA) nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável da cadeia β 1 do gene DRB1, denominada epítipo compartilhado (EC), estão associados com maior susceptibilidade e gravidade para artrite reumatóide (AR) em diversas populações. Uma nova classificação proposta por Du Montcel et al tem sido desenvolvida para apurar a associação entre HLA-DRB1 e AR. Este estudo foi desenhado com o objetivo de determinar a frequência dos alelos HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com AR, e sua associação com o fator reumatoide (FR), anticorpos antipeptídeos citrulinados (ACPA) e lesão radiográfica articular e óssea. Quatrocentos e doze pacientes com AR e 215 controles foram incluídos. A tipificação HLA-DRB1 foi realizada pela reação em cadeia de polimerase (PCR) usando *primers* específicos e hibridação com oligonucleotídeos de sequência específica (SSOP). A pesquisa de ACPA foi determinada pela técnica de ELISA e a do FR por nefelometria, a avaliação radiográfica realizada pelo método do índice de Sharp modificado de Van Der Heijde. Para análises estatísticas foram utilizados os testes do qui-quadrado, t de Student e a regressão logística. Nos pacientes com AR alelos HLA-DRB1*04:01, *04:04, *04:05 se associaram com AR ($p < 0,05$), embora o amplo intervalo de confiança, vale a pena ressaltar a associação observada com o alelo DRB1*09:01 e a doença ($p < 0,05$). Alelos HLA-DRB1 EC+ foram observados em 62,8% dos pacientes e em 31,1% do grupo controle (OR 3,62; $p < 0,001$) e estiveram associados com ACPA (OR 2,03; $p < 0,001$). Alelos DRB1 DERAA mostraram efeito protetor para a AR (OR 0,42; $p < 0,001$). A análise da nova classificação de HLA-DRB1 mostra que S2 e S3P se associaram a AR ($p < 0,05$). Alelos S2 e/ou S3P esteve presente em 65% dos pacientes e 32% do grupo controle (OR 3,86; $p < 0,001$) e estiveram associados a ACPA (OR 2,11; $p = 0,001$). Alelos S3D, S1, X mostraram efeito protetor para a AR. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que pacientes brasileiros com AR de etnia majoritariamente mestiça, alelos HLA-DRB1 avaliados segundo a hipótese do EC e a classificação proposta por Du Montcel estiveram associados à suscetibilidade à doença e à presença de ACPA.

Palavras-chave: HLA-DRB1. Epítipo compartilhado. Artrite reumatóide. Polimorfismo gênico. Imunogenética.

ABSTRACT

HLA-DRB1 alleles that encode an amino acid sequence at positions 70-74 of the third hypervariable region of the B chain of the DRB1 gene, called shared epitope (SE), are associated with increased susceptibility and severity to rheumatoid arthritis (RA) in different populations. A new classification proposed by Du Montcel et al has been developed to determine the association between HLA-DRB1 and RA. This study was designed to determine the frequency of HLA-DRB1 alleles in Brazilian patients with RA, and its association with rheumatoid factor (RF), citrullinated peptide antibodies (ACPA) and radiographic joint damage and bone. Four hundred and twelve patients with RA and 215 controls were included. The HLA-DRB1 typing was performed by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and hybridization with sequence specific oligonucleotides (SSOP). The survey of ACPA was determined by ELISA and the RF by nephelometry, the radiographic evaluation by index method modified Sharp Van Der Heijde. For statistical analysis we used the chi-square, Student and logistic regression. In patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1*04:01, *04:04, *04:05 are associated with RA ($p < 0,05$), although the wide confidence interval, it is worth noting the association observed with the DRB1*09:01 allele and the disease ($p < 0,05$). HLA-DRB1 SE+ were observed in 62.8% of patients and in 31.1% of the control group (OR 3.62, $p < 0,001$) and were associated with ACPA (OR 2.03, $p < 0,001$). DERRA alleles showed a protective effect against RA (OR 0,42, $p < 0,001$). The analysis of the new classification of HLA-DRB1 shows that S2 and S3P were associated with RA ($p < 0,05$). Alleles S2 and/or S3P was present in 65% and 32% of patients in the control group (OR 3,86, $p < 0,001$) and were associated with ACPA (OR 2.11, $p = 0,001$). S3D alleles, S1, X showed a protective effect against RA. The results of this study demonstrate that Brazilian patients with RA from mostly mixed ethnicity, HLA-DRB1 evaluated under the hypothesis of the SE and the classification proposed by Du Montcel et al were associated with disease susceptibility and the presence of ACPA.

Keywords: HLA-DRB1. Shared epitope. Rheumatoid arthritis. Genetic polymorphism. Immunogenetic.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação dos alelos HLA-DRB1 e riscos relativos proposta por Du Montcel et al.....	23
Tabela 2 –	Pontuação de erosões e diminuição dos espaços articulares segundo o método de Sharp – Van Der Heijde.....	33
Tabela 3 –	Caracterização demográfica e clínico laboratorial de pacientes com artrite reumatóide e controle.....	49
Tabela 4 –	Frequências dos grupos alélicos do HLA-DRB1 (baixa resolução) em pacientes com artrite reumatóide e grupo controle.....	50
Tabela 5 –	Frequência alélica do HLA-DRB1 em pacientes com artrite reumatóide e grupo controle.....	51
Tabela 6 –	Especificidades individuais de HLA-DRB1 associados à artrite reumatóide entre brasileiros de acordo com genótipos relacionados a presença do epítipo compartilhado.....	53
Tabela 7 –	Efeito da dose de alelos na susceptibilidade à artrite reumatóide em pacientes com AR entre brasileiros.....	54
Tabela 8 –	Frequências de genótipos HLA-DRB1 de susceptibilidade (EC) e de proteção (DERAA) em pacientes com artrite reumatóide e grupo controle.....	55
Tabela 9 –	Frequência de alelos HLA - DRB1 epítipo compartilhados e autoanticorpos em 412 pacientes com artrite reumatóide.....	56
Tabela 10 –	Distribuição dos pacientes com artrite reumatóide de acordo ao tempo de doença, HLA-DRB1 EC e índice de Sharp modificado de Van Der Heijde.....	57
Tabela 11 –	Distribuição dos genótipos, tempo de doença, HLA-DRB1 EC e score de Sharp modificado de Van Der Heijde.....	58
Tabela 12 –	Frequência de alelos HLA-DRB1 de acordo a classificação de Du Montcel em pacientes e controles.....	59
Tabela 13 –	Distribuição de genótipos nos pacientes e controles segundo a classificação de Du Montcel.....	60
Tabela 14 –	Distribuição do genótipo HLA-DRB1 reduzido e risco para AR de acordo a classificação de Du Montcel.....	61

Tabela 15 –	Relação entre alelos HLA-DRB1 e o fator reumatoide nos pacientes com artrite reumatóide de acordo a classificação de Du Montcel.....	62
Tabela 16 –	Relação entre alelos HLA-DRB1 e ACPA nos pacientes com artrite reumatóide de acordo a classificação de Du Montcel.....	63
Tabela 17 –	Associação de alelos HLA-DRB1 de maior gravidade de acordo a classificação de Du Montcel e autoanticorpos em pacientes com artrite reumatóide.....	64
Tabela 18 –	Distribuição de níveis séricos de FR e ACPA positivos e alelos HLA-DRB1 de acordo a classificação de Du Montcel em pacientes com artrite reumatóide.....	64
Tabela 19 –	Distribuição dos pacientes com artrite reumatóide de acordo ao tempo de doença, HLA-DRB1 EC segundo a classificação de Du Montcel e índice de Sharp modificado de Van Der Heijde.....	66
Tabela 20 –	Distribuição dos pacientes com artrite reumatóide de acordo ao tempo de doença, índice de Sharp modificado de Van Der Heijde e alelos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel.....	67
Tabela 21 –	Distribuição dos pacientes com artrite reumatóide de acordo ao tempo de doença, índice de Sharp modificado de Van Der Heijde e genótipos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AR	Artrite Reumatóide
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
ACPA	Anticorpo Anti-peptídeo Cíclico Citrulinado (<i>Antibody Anti-peptide Cyclyc Citrullinated</i>)
A	Alanina
CTLA 4	Antígeno de Linfócito T Citotóxicos 4 (Citotoxic T- lymphocyte antigen 4)
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
D	Ácido Aspártico
DP	Desvio Padrão
E	Ácido Glutâmico
EC	Epítopo Compartilhado
FR	Fator Reumatóide
GWAS	Estudo de Associação de Genomas Completo (<i>Genome-Wide Association Studies</i>)
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (<i>Human Leucocyte Antigen</i>)
HAQ	Questionário de Avaliação de Saúde (<i>Health Assessment Questionnaire</i>)
IL-1	Interleucinas-1
IL-6	Interleucinas- 6
K	Lisina
MCH	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
OR	Razão de Chance (<i>Odds Ratio</i>)
PTPN22	Proteína Tirosina Fosfatase no Receptor N 22 (<i>Protein Tyrosin Fosfatasa no receptor 22</i>)
PADs	Peptidil Arginina Deaminase
PCR	Proteína C Reativa
Q	Glutamina
R	Arginina
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeos Simples (<i>Single Nucleotídeos Polymorphism</i>)
STAT 4	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 4 (<i>Signal Transducer and</i>

Activator of Transcription 4)

TRAF1-C5	Codificador do Receptor do Fator de Necrose Tumoral Associado ao Fator 1 e Codificador do Complemento 5
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAF6	Receptor de TNF associado a fator 6 (<i>TNF receptor- associated fator 6</i>)
TNFAIP3	Fator de Necrose Tumoral Alfa, Induzida por proteína 3 (Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3)
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	CARACTERÍSTICAS DA ARTRITE REUMATÓIDE.....	17
1.1	Epidemiologia da artrite reumatóide.....	17
1.2	Etiologia.....	18
1.2.1	<u>Fatores genéticos.....</u>	18
1.2.1.1	O papel do HLA na artrite reumatóide.....	19
1.2.1.2	Outros genes implicados na suscetibilidade da AR.....	24
1.2.2	<u>Fatores ambientais.....</u>	25
1.3	Fisiopatogênese da artrite reumatóide.....	26
1.4	Manifestações clínicas da artrite reumatóide.....	27
1.5	Diagnóstico e critério de classificação da artrite reumatóide.....	28
1.6	Características laboratoriais na artrite reumatóide.....	28
1.6.1	<u>Fator reumatóide e o seu papel na artrite reumatóide.....</u>	29
1.6.2	<u>ACPA e a sua relação com artrite reumatóide.....</u>	30
1.7	Avaliação radiológica.....	32
1.8	Fatores de mau prognóstico.....	33
2	JUSTIFICATIVA.....	34
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo principal.....	35
3.2	Objetivo secundário.....	35
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	36
4.1	Desenho do estudo.....	36
4.1.1	<u>População de estudo.....</u>	36
4.1.1.1	Pacientes com artrite reumatóide.....	36
4.1.1.2	Grupo controle.....	37
4.2	Procedimentos.....	38
4.2.1	<u>Deteção do DNA e do polimorfismo de HLA-DRB1.....</u>	38
4.2.1.1	Extração do DNA.....	38
4.2.1.2	Tipagem dos grupos de alelos HLA-DRB1.....	39
4.2.1.3	Interpretação dos resultados.....	42
4.2.2	<u>Avaliação de FR, ACPA.....</u>	44

4.2.3	<u>Avaliação radiográfica</u>	44
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
6	PROCEDIMENTOS ÉTICOS	47
7	RESULTADOS	48
7.1	Características demográficas, clínicos e laboratoriais de pacientes com AR e controles	48
7.2	Associação de alelos HLA – DRB1 com artrite reumatóide	50
7.3	Associação dos alelos HLA-DRB1 do epítipo compartilhado na suscetibilidade à artrite reumatóide	52
7.4	Associação dos alelos HLA-DRB1-DERAA na proteção ao desenvolvimento da AR	54
7.5	Associação entre alelos HLA-DRB1 de susceptibilidade (EC) e presença de autoanticorpos	55
7.6	Relação do índice de Sharp modificado de Van Der Heijde e alelos HLA-DRB1 EC	56
7.7	Associação com a suscetibilidade e proteção para AR dos alelos HLA-DRB1 segundo a classificação de Du Montcel	58
7.8	Associação de genótipos HLA-DRB1 de acordo a classificação de Du Montcel na suscetibilidade à artrite reumatóide	59
7.9	Associação entre alelos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel e presença de autoanticorpos	61
7.10	Relação do índice de Sharp modificado de Van Der Heijde e alelos HLA-DRB1 EC de acordo a nova classificação proposta por Du Montcel	65
8	DISCUSSÃO	69
9	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com artrite reumatóide	83
	APÊNDICE B - Ficha clínica dos pacientes com artrite reumatóide	85
	APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido para o grupo controle	88
	APÊNDICE D - Ficha para o grupo controle	90
	APÊNDICE E – Artigo científico publicado	91

INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica crônica, caracterizada pelo acometimento inflamatório da membrana sinovial das articulações, levando à destruição óssea e cartilaginosa. Sua prevalência na população adulta mundial é de 0,5 a 1% e no Brasil é de 0,46%. (1) Apresenta pico de incidência entre a quarta e sexta décadas, sendo duas a três vezes mais frequente em mulheres do que em homens. (2)

Embora sua etiologia permaneça desconhecida, a sua patogenia é multifatorial e fatores genéticos contribuem com aproximadamente 60% do risco total, (3, 4) dentre os possíveis fatores genéticos, o HLA-DRB1 aparece claramente associado a AR, (5) associação sugerida pela primeira vez por Stastny (6) e posteriormente organizado por Gregersen et al, (7) que demonstrou que a AR, associa-se com vários alelos HLA-DRB1 (DRB1*01:01, *01:02, *04:01, *04:04, *04:05, *04:08, *10:01 e *14:02) que codificam uma sequência de aminoácidos compartilhada (QKRAA/QRRRA/RRRAA) localizada no sulco de ligação ao peptídeo, nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável da molécula HLA-DRB1, sequência denominada de epitopo compartilhado (EC).

Mais recentemente, Tezenas Du Montcel et al, (8) propuseram uma nova classificação reconsiderando a hipótese do EC na suscetibilidade à AR. De acordo com esta nova classificação, o risco para desenvolver AR dependeria estritamente da sequência dos aminoácidos RAA nas posições 70 a 72 modulada pelos aminoácidos na posição 71 e 70, que levou à definição de 5 grupos de alelos HLA-DRB1 S1, S2, S3D, S3P, X. Mais tarde Michou et al (9) validaram esta nova classificação e observaram que genótipos S2/S3P mostraram maior risco para AR. Outros autores mostraram que estes alelos HLA-DRB1 estariam associados aos ACPA, FR (10, 11) e doença agressiva. (12)

1 CARACTERÍSTICAS DA ARTRITE REUMATÓIDE

A Artrite Reumatóide é uma doença sistêmica, crônica, caracterizada pelo acometimento principalmente das articulações sinoviais periféricas, (13) que pode levar à destruição e deformidade articular em virtude da presença de erosões ósseas e da cartilagem. Tipicamente, a AR acomete pequenas e grandes articulações, associada, geralmente, com manifestações sistêmicas como: rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Quando acomete outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo reduzir a expectativa de vida em cinco a dez anos. (14) Existem pacientes que apresentam uma doença de curso benigno, com pouca destruição articular e, eventualmente até remissão espontânea da doença. (15)

1.1 Epidemiologia da artrite reumatóide

A AR é uma das doenças reumáticas de natureza inflamatória mais frequentes. Sua incidência e prevalência apresentam variações entre as diferentes regiões geográficas do mundo. Diversos estudos realizados na Europa, América do Norte, Ásia e África do Sul estimaram uma prevalência entre 0,5% e 1% (16). Em latino-americanos a prevalência é de 0,5 %. (17) Na população Brasileira Senna e colaboradores em 2004, estimaram uma taxa de prevalência de 0,46% (1). Embora possa iniciar-se em qualquer faixa etária, sua incidência aumenta com a idade, ocorrendo, mais frequentemente, na faixa dos 40 a 70 anos. (13)

A doença acomete ambos os sexos, mas há predomínio do feminino, sendo 2 a 4 vezes mais frequente nas mulheres do que nos homens.

Seu caráter hereditário é evidenciado a partir da observação de que a AR é mais prevalente em parentes de primeiro grau de pacientes com AR do que na população em geral. Diversos estudos mostram um risco aumentado em 30 vezes para o desenvolvimento da doença entre gêmeos monozigóticos e 6 vezes entre os dizigóticos e irmãos não-gêmeos. (18)

1.2 Etiologia

A AR é uma doença complexa, multifatorial, de causa desconhecida, na qual parece haver uma interação entre fatores genéticos, infecciosos, ambientais e alterações endócrinas (16). Destes fatores, os mais fortemente associados e descritos com o desenvolvimento da AR são os genéticos e ambientais.

1.2.1 Fatores genéticos

Estudos realizados em familiares (19) demonstram a contribuição da herança na suscetibilidade da AR. Mac Gregor et.al, estimaram que o componente genético estaria associado com aproximadamente 60 % do risco total para o desenvolvimento da AR. (4)

Embora vários genes tenham sido associados com esta doença, o HLA (do inglês, *Human leucocyte antigen*) é o locus mais importante, responsável por 30 % a 50 % da suscetibilidade genética para AR. (20) No locus HLA a associação mais forte é com alelos de DRB1, que codificam a cadeia β da molécula HLA-DR de classe II. Recentes evidências, entretanto, indicam que outros genes HLA também podem estar contribuindo para susceptibilidade da AR. (21) Fora do locus HLA, a associação mais forte, assim identificada é com o gene proteína tirosina fosfatase no receptor N 22 (PTPN22) que confere um risco de 8%. (22) A investigação genética de doenças complexas como a AR teve um grande impulso graças aos avanços biotecnológicos recentes, que permitiram o estudo completo de associação de genomas - GWAS (do inglês, *Genome-wide association studies*) para identificação de alelos de risco. Os GWAS confirmaram que o HLA é o principal fator de risco genético para a AR, sendo o PTPN22 o segundo gene mais importante. Vários alelos de risco adicional para a doença foram identificados nas regiões que contém TRAF 1 (locus C5), STAT 4 (do inglês *signal transducer and activator of transcription 4*) e genes OLIG3-AIP3. Estes novos achados, assim como dados complementares de estudos sobre genes-candidatos, indicam que uma série de genes, em conjunto, predispõem ao risco de AR. (23)

1.2.1.1 O papel do HLA na artrite reumatóide

As moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MCH do inglês *Major Histocompatibility Complex*) de classe II estão presentes apenas nas superfícies de alguns tipos celulares, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, que em conjunto são denominados de células apresentadoras de antígenos (APC do inglês *antigen-presenting cell*).

Essas moléculas são um heterodímero, contendo cadeias α e β , ambas ancoradas à membrana, e são encarregadas de apresentar peptídeos próprios ou não-próprios às células T CD4, levando a um estado de anergia ou a resposta imune adaptativa contra o peptídeo antigênico. (24)

As cadeias α e β das moléculas de classe II são codificadas pelos genes HLA-DR, DP e DQ, localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Esta região possui densidade gênica elevada, contendo cerca de 220 genes, muitos dos quais com funções imunorreguladoras. As cadeias α e β das moléculas de classe II contêm dois domínios extracelulares, denominadas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$, $\beta 2$, e um sulco de ligação ao peptídeo formado pela interação dos segmentos $\alpha 1$ e $\beta 1$. (24, 25)

Uma das principais características do sistema HLA é seu extremo polimorfismo, oriundo tanto das cadeias α quanto das cadeias β . É importante ressaltar, entretanto, que para as moléculas DR, o polimorfismo ocorre apenas no domínio $\beta 1$ da cadeia β . (25)

A associação entre o HLA e AR foi inicialmente proposta por Stastny em 1978, que demonstrou uma frequência aumentada de alelos HLA-Dw4 em pacientes com AR.(6) Com o desenvolvimento da tipificação por alta resolução de HLA-DRB1 demonstrou-se que os diferentes alelos HLA-DRB1 não estão igualmente associados com AR. Estudos realizados em diversos grupos étnicos mostraram a existência de variações consideráveis em relação à associação dos alelos de HLA-DRB1 com AR. (26) Alelos HLA-DRB1*04:01 *04:04 estavam associados à suscetibilidade da doença em indivíduos caucasianos do norte da Europa e Estados Unidos. (27) Em coreanos, japoneses e chineses o principal alelo descrito foi o HLA-DRB1*04:05. (28, 29) Em judeus israelenses, gregos e espanhóis os alelos HLA-DRB1*01:01 e *10:01 foram os mais encontrados. (30) Em índios nativos americanos e peruanos o alelo HLA-DRB1*14:02 (16, 31) foi o mais observado. Nos pacientes colombianos e argentinos o alelo HLA-DRB1*04:04 foi associado com a AR. (32, 33)

No Brasil, Bértolo et al, (14) observaram associação da AR com DRB1*01:01 e *01:02 em 65 pacientes caucasóides. Mais recentemente, Louzada et al, (34) encontraram associação da doença com os alelos DRB1*04:01, DRB1*04:04, DRB1*04:05, DRB1*01:01 e DRB1*10:01 em 140 pacientes, de maioria étnica caucasóide.

Resultados que demonstram uma diversidade de alelos HLA-DRB1 associados à AR nas diferentes populações, que foram unificadas em 1987 por Gregersen et. al, baseados na hipótese do epítipo compartilhado (EC). (7, 35)

A hipótese do epítipo compartilhado

Estudos têm demonstrado diferentes alelos HLA-DRB1(*01:01*01:02*04:01*04:04*04:05 *14:02*10:01) associados a AR. A análise molecular destes alelos revela que indivíduos apresentando esses alelos codificam uma sequência de cinco aminoácidos compartilhada QKRAA / QRRAA / RRRRAA (onde Q= glutamina; K= Lisina; R= Arginina e A= Alanina), localizada no sulco de ligação ao peptídeo, nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável da molécula HLA-DR, denominada de epítipo compartilhado (EC). A explicação funcional da hipótese do EC para a suscetibilidade à AR, está baseada em que esta sequência de aminoácidos participaria diretamente na apresentação de peptídeos artritogênicos às células T CD4 provocando uma resposta imune que resultaria na AR. (7)

Além do estudo descrito por Gregersen mostrando associação do EC com AR, Balsa et al, recentemente também encontraram frequência maior de alelos HLA-DRB1 com EC em 408 pacientes com artrite inicial. (36)

Embora, os relatos da literatura não sejam homogêneos, os alelos HLA-DRB1 com EC têm sido relacionados à gravidade da doença. Meyer et al, em 1999 observaram, que a presença de genótipos HLA-DRB1 com EC homozigotos ou heterozigotos conferem maior risco relativo para AR e fator reumatóide positivo em títulos elevados. Ainda que, só genótipos heterozigotos tivessem maior risco para a doença, principalmente nos homens e, nestes, associados também à presença de nódulo reumatóide. (37)

Um outro estudo mostrou que a presença de alelos HLA-DR*04 estaria associada a doença mais grave e erosiva e o alelo HLA-DR*01, assim como outros alelos, a doença menos grave. (38) Matthey et al, em um estudo realizado em 2007, observaram que só a presença do EC não teve associação significativa com a mortalidade em geral, enquanto que, a presença de genótipo homozigoto com EC associa-se com o risco de mortalidade por

isquemia, de doença cardíaca e tumores malignos. A análise de genótipos específicos mostrou que os HLA-DRB1*01:01/*04:01 e HLA-DRB1*04:04/*04:04 estão significativamente associados à mortalidade por cardiopatia isquêmica e os genótipos HLA-DRB1*01:01 com a mortalidade devida a processos tumorais. O genótipo HLA-DRB1*01:01/*04:01 mostrou possível interação com o tabagismo. (39)

Reveille et al, observaram que a presença e o número de cópias de alelos HLA-DRB1 com EC associa-se à presença de nódulo reumatóide, assim como, com maior e rápida destruição articular, síndrome de Felty e vasculites. (40)

De igual importância é a capacidade da presença do EC de prever a resposta ou não a um tratamento específico. O estudo descrito por O Dell et al, evidenciou que 50 % dos pacientes com alelos HLA-DRB1 EC + respondiam à combinação de metotrexato, sulfassalazina e hidroxicloroquina quando comparado aos pacientes utilizando só metotrexato. Por outro lado, os pacientes com alelos HLA-DRB1 EC- respondiam bem independentemente do tratamento. Adicionalmente os pacientes com EC positivos ou negativos responderam igualmente bem à terapia combinada. (35)

É importante também mencionar, que a hipótese do EC não explica totalmente a suscetibilidade genética conferida pelo HLA para AR. Embora, exista associação forte com o locus HLA-DRB1, trinta por cento da população caucasóide normal é positiva para HLA-DRB1*04, o que demonstra que a presença do EC não é necessária nem suficiente para desenvolver a doença. (5)

Alelos HLA-DRB1 protetores para artrite reumatóide

Ainda que a hipótese do EC seja aceita como fator predisponente para AR, existem controvérsias acerca de possíveis efeitos de proteção de determinados alelos HLA-DRB1.

Estudos têm mostrado que os alelos protetores são: HLA-DRB1*01:03,*04:02,*11:02,*11:03,*13:01*13:02 e *13:04 que codificam uma sequência de aminoácidos DERAA (onde D= ácido aspártico, E= ácido glutâmico, R= arginina, A= alanina) nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável da molécula HLA-DRB1.

A presença destes aminoácidos DERAA na posição do EC sugere a presença de doença com menor agressividade. (41) Em 2005, Van der Helm-van Mil et al, demonstraram numa população de caucasóides (440 pacientes e 423 controles) que alelos codificantes para DERAA têm efeito protetor frente ao desenvolvimento de AR tanto em indivíduos com EC positivo ou EC negativo. Adicionalmente, os pacientes portadores desta sequência de DERAA apresentaram menor destruição articular após quatro anos de seguimento, ainda que

apresentassem outros fatores associados à gravidade da doença, como o fator reumatóide positivo (FR) e anticorpos anti-peptídeos citrulinados (ACPA) positivos e tabagismo. Concluiu-se portanto que a proteção associada ao DERAAs seria independente do EC. (42)

No estudo realizado por Carrier et al, a presença de pelo menos um alelo DERAAs teve um efeito protetor significativo para o desenvolvimento da doença, inclusive para doença agressiva (OR 0,51; $p < 0,05$), Enquanto nenhuma proteção similar foi encontrada com o alelo EC. Ainda o mesmo autor, observou que a presença de um alelo DR3 não foi associada com doença erosiva ou doença grave em 30 meses (OR 0,77; IC 95% 0,42-1,43). (43)

A participação dos alelos HLA-DRB1 DERAAs conferindo proteção contra AR, no Brasil também foi observado em 2008 (OR 0,49; IC 95% 0,31-0,77). (34)

A nova classificação do epítipo compartilhado e a sua importância na AR

Em 2005, Du Montcel e colaboradores, propuseram um novo modelo de classificação dos alelos HLA-DRB1 reconsiderando a hipótese do EC na suscetibilidade da AR. Os alelos HLA-DRB1 foram divididos em dois grupos segundo a presença ou ausência dos aminoácidos arginina, alanina, alanina (RAA) nas posições 72 a 74. Alelos com a sequência de aminoácidos RAA são classificados como alelos S e os restantes classificados como alelos X. Os alelos tipo S ainda são subclassificados em 3 categorias, em função do aminoácido presente na posição 71, da seguinte maneira: S1 quando uma alanina ou ácido glutâmico estava presente na posição 71; S2 quando uma lisina estava presente (K-RAA); e S3 na presença do aminoácido arginina. (8) Os alelos S3 foram subclassificados de acordo com o aminoácido presente na posição 70 em: alelos S3D quando presente o ácido aspártico (D-R-RAA); e S3P quando uma glutamina ou arginina estava presente na posição 70 (Q-R-RAA ou R-R-RAA). O alelo S2 tem uma glutamina ou ácido aspártico na posição 70 (Q-K-RAA ou D-K-RAA). Resultam, por tanto, de acordo com esta nova classificação de alelos HLA-DRB1 proposta Montcel e colaboradores, cinco alelos: S1, S2, S3P, S3D e X. Esta nova classificação agrega também os diferentes riscos relativos para cada grupo de alelos, baseados em que o EC com RAA nas posições 72 a 74, requer pelo menos um aminoácido carregado positivamente nas posições 70 a 71, mais especificamente na posição 71, para serem artritogênicos. Sendo assim, a presença de lisina no alelo S2 conferiria um risco maior para AR, e a presença de arginina no alelo S3P risco intermediário. No entanto, a presença de aminoácidos com carga negativa nas posições 70 ou 71 impede a ligação com o EC, conferindo risco baixo e menor suscetibilidade para AR, expressos nos alelos S1 e S3D. Os alelos X são protetores e não conferem suscetibilidade para a doença. (8) Tabela 1

Tabela 1 - Classificação dos alelos HLA-DRB1 e riscos relativos proposta por Du Montcel

Nova Classificação	Seqüência de AA nas Posições 70 –74	Alelos HLA-DRB1	Risco AR
S2	Q-K-RAA D-K-RAA	*04:01 *13:03	Alto
S3P	Q-R-RAA R-R-RAA	*01:02 *04:04 *04:05 *04:08 *01:01	Intermediário
S3D	D-R-RAA D-E-RAA	*11:01 *11:04 *12 *13:05 *13:06 *13:25 *14:22 *16 *01:03 *04:02 *11:02 *11:03 *13:01 *13:02 *13:04 *13:23	Baixo
S1	Q-A-RAA	*15	
X	Q-K-TCR Q-R-RAE D-R-RGQ D-R-RAL R-R-ERA	*03 *04:03 *04:07 *04:11 *07 *08 *09:01 *14:01 *14:04	Sem risco

Em 2006 Michou et al, (9) provaram e validaram a proposta da nova classificação dos alelos HLA-DRB1 proposta por Du Montcel et al, (8) através de um estudo realizado em 100 famílias (1 paciente com AR e os pais) de origem francesa e etnia caucasóide. Assim como Du Montcel et al, este estudo mostrou que alelos S2 e S3P têm aumento significativo na transmissão de AR e alelos S3D, S1 e X conferem menor risco para a doença. Para fins de análise os dois estudos agruparam os alelos de baixo risco de transmissão (S1, S3D, X) no alelo denominado L. Assim, nas análises posteriores, consideraram só 3 alelos (S2, S3P e L) e 6 genótipos correspondentes (S2S2; S2S3P; S2L; S3PS3P; S3PL e LL). Através de uma análise de regressão logística, Michou et al, (9) demonstraram que genótipos S2S3P e S2S2 associam-se com maior risco para a AR com um OR de 19,5 e 18 respectivamente, seguidos pelos genótipos S3PS3P, S2L, S3PL com OR de 8,5; 5,3 e 3,1 respectivamente, como já observado por Du Montcel e colaboradores em 2005. A nova classificação dos alelos HLA-DRB1 segundo Michou, proporciona melhores estimativas de risco para a AR, assim como pode proporcionar também uma melhor compreensão da genética, fisiopatologia e possível uso clínico no tratamento da AR.(9)

A importância desta nova classificação dos alelos HLA-DRB1, associada com a gravidade estrutural da AR, foi avaliada no estudo prospectivo longitudinal realizado por Pierre-Antoine Gourraud et al, que incluíram 144 pacientes caucasóides com diagnóstico de

AR de início recente, onde alelos S2 (HLA-DRB1*04:04 e *13:03) foram significativamente associados a formas graves da doença, enquanto que os alelos S3D (HLA-DRB1*11:01*11:04*12 e *16) foram associados a formas leves da AR. (12) Mais tarde o mesmo autor e colaboradores, estudaram a relevância desta nova classificação em relação aos autoanticorpos FR, ACPA e antifibrinogênio, estudo no qual foram incluídos 160 pacientes caucasóides com diagnóstico de AR de início recente. Evidenciaram que os alelos S2 e S3P associaram-se com a formação destes autoanticorpos, enquanto que os alelos S1, S3D parecem ser protetores para a sua formação em pacientes com AR de início recente. (10)

Thomas Barnetche et al, (44) investigaram a relação da nova classificação de alelos HLA-DRB1 com suscetibilidade para a AR, em pacientes caucasóides e não caucasóides de 10 diferentes regiões. Este estudo mostrou que, na população caucasóide existe associação significativa entre alelos S2 e S3P e a suscetibilidade da doença com OR 2,61; IC 95% 1,87-3,6 e OR 1,86; IC 95% 1,39-2,49. Enquanto que, associação negativa foi observada para os alelos S1 e X com OR 0,59; IC 95% 0,45-0,79 e OR 0,74; IC 95% 0,56-0,96 respectivamente.

Na população não caucasóide, os alelos S3P (OR 2,93; IC 95% 2,21-4,04) foram associados significativamente à suscetibilidade da AR, e os alelos S1 e alelos X mostraram ter efeito protetor com OR 0,52; IC 95% 0,37-0,71 e OR 0,61; IC 95% 0,45-0,83 respectivamente. (44)

Após uma avaliação dos alelos HLA-DRB1 por três sistemas diferentes de classificação, em um estudo que incluiu 1,325 pacientes com AR e 462 controles sadios caucasóides do Reino Unido, Morgan et al, confirmaram a associação entre a suscetibilidade da AR e os alelos S2 e S3P e assim, como proposta por Du Montcel, observaram também um hierarquia de risco significativo dentro do grupo de alelos S3P. Por outro lado, não foi achada associação significativa entre alelos HLA-DRB1*1001 e AR. Os autores também não apóiam a hipótese de que o aminoácido isoleucina presente na posição 67 confira proteção contra AR, porém, acreditam que a presença do aminoácido ácido aspártico na posição 70, possa conferir algum grau de proteção para a doença. (26)

1.2.1.2 Outros genes implicados na suscetibilidade da AR

Como descrito anteriormente, além dos alelos HLA-DRB1, estudos com técnicas modernas como os estudos de genoma completo (GWAS) e marcadores genéticos de polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP), têm mostrado que o gene da PTPN22 é o

segundo gene associado à suscetibilidade da AR. (23) Também foi identificado um grande número de genes associados que requerem confirmação e reprodução por outros estudos, entre eles o do codificador do receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator 1 e codificador do complemento 5 (TRAF1-C5) localizado no cromossoma 9, que teria maior risco para AR ACPA+ (45). Entre outros genes importantes associados a AR estão: CTLA 4, STAT 4, PAD14, CD28, CD40, TRAF6, IL-2, TNFAIP3, REL, KIF5A. (46)

Recentemente, Elizabeth Karlson et al, realizaram um estudo prospectivo avaliando 22 alelos de risco para AR soropositivo (8 alelos HLA e 14 alelos não HLA), com a finalidade de identificar o risco destes alelos para indivíduos assintomáticos e sugerir medidas preventivas. Os autores observaram que, devido a baixa incidência, a utilidade clínica do risco genético é baixa na população em geral. (47)

1.2.2 Fatores ambientais

O tabagismo foi mostrado ser um fator de risco ambiental para AR nos pacientes com fator FR e ACPA positivos, quando comparado ao subgrupo de pacientes com AR com FR e ACPA negativos, nos quais o tabagismo tem efeito menor ou nenhum. (23) Além do risco, considerado importante, estaria também relacionado com gravidade da doença e com a presença de manifestações extra-articulares, principalmente quando associado à presença de FR. (48) Correlação maior entre o tabagismo, alelos HLA e ACPA ou FR positivos foi observada em pacientes europeus e norte americanos com AR. (23) Em 2007 Lee et al, mostraram também que existe associação entre o tabagismo e a presença do EC com a formação de ACPA nos pacientes com AR. (49) Um outro estudo do mesmo ano, mostrou que os alelos HLA-DRB1 EC *04:01, *04:04 *04:05 e *04:08 e o tabagismo conferem um risco maior de desenvolver ACPA (OR 6,2; IC 95% 3,7-10,5 e OR 7,1; IC 95% 4,0-12,5 respectivamente). (50)

Acredita-se que quando o pulmão entra em contato com o tabaco (ou outras substâncias tais como poeira de sílica, carvão e também infecções), algumas células são ativadas para entrarem em apoptose, necrose ou ambas. Este processo leva a um aumento de síntese e atividade das enzimas Peptidil Arginina Deaminase (PADs) que causam a citrulinização (mudança da arginina para citrulina) em certas proteínas do pulmão. Estas proteínas se ligam

a moléculas de HLA-DR que contêm o EC, processo este que determina a força da resposta imune para peptídeos citrulinados. (23)

1.3 Fisiopatogênese da artrite reumatóide

Na patogênese da AR acontecem dois tipos de fenômenos: um que leva à inflamação articular, provavelmente mediado pelos linfócitos T, e outro que leva a destruição articular, no qual vasos de neoformação, células sinoviais, células tipo fibroblastos e macrófagos, constituem o tecido de granulação que destruiria a cartilagem e o osso.

Na etapa inicial da doença, a inflamação pode ser iniciada por um antígeno “artritogênico”, ainda desconhecido que pode ser endógeno, exógeno ou a combinação de ambos. Bactérias e vírus têm sido implicados, entre eles o vírus Epstein-Barr, micoplasma, parvovírus, mycobacterium e outros. O MCH de classe II promove a apresentação de peptídeos antigênicos para as células T CD4+. A resposta do organismo a esses antígenos promoveria uma resposta auto-imune mediada por linfócitos T. Os linfócitos T continuariam a responder aos antígenos próprios, perpetuando o processo inflamatório, mesmo sem a persistência da exposição ao antígeno. Os linfócitos T CD4+ estimulam os monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzirem citocinas como interleucinas-1(IL-1), interleucina -6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF), além de metaloproteinases. As citocinas ativam outras citocinas pró-inflamatórias na AR, que são substâncias que levariam ao estímulo dos fibroblastos da sinóvia, à síntese da colagenase que estimula à reabsorção óssea, e manteriam o processo de reconhecimento antigênico já iniciado. (51)

Além dos linfócitos T, estudos demonstram a importância dos linfócitos B na AR. Esses linfócitos estão presentes nos infiltrados inflamatórios sinoviais e nos centros germinais. Os linfócitos T CD4+ estimulam células B a produzir imunoglobulinas, incluindo o FR que corresponde a auto-anticorpos que têm a porção Fc da IgG como antígeno. O FR promove a ativação do complemento por meio da formação de imunocomplexos com fixação de complemento estimulando a inflamação e levando a sinovite crônica. A fase crônica é caracterizada por uma membrana hiperplásica, com formação de um tecido de granulação que recobre a cartilagem e o osso subcondral (pannus). O pannus é um tecido invasivo composto por células que produzem grandes quantidades de enzimas destrutivas que progressivamente substitui cartilagem hialina, levando a anquilose fibrosa ou óssea. (51)

1.4 Manifestações clínicas da artrite reumatóide

A AR em 60 a 70 % dos casos, costuma se instalar de forma insidiosa e progressiva, podendo levar de semanas a meses até a doença se estabelecer completamente. Em aproximadamente 15 a 30 % dos pacientes o início da doença se faz de forma aguda. Em alguns pacientes podem se iniciar com manifestações sistêmicas que consistem em astenia, fadiga, mal-estar, febre baixa, ou dores musculoesqueléticas vagas. Com a evolução do quadro, a doença geralmente assume a sua forma clássica, caracterizada especialmente por artrite simétrica nas pequenas articulações como as metacarpofalangianas, interfalangianas proximais, metatarsofalangianas, punhos, assim como nas articulações temporomandibulares. Outras articulações maiores costumam também ser afetadas como os joelhos, cotovelos, tornozelos, coluna cervical e articulações coxofemorais. Porém, é importante ressaltar que o acometimento articular da doença pode variar desde monoarticular, oligoarticular até poliarticular, sendo como já descrito o mais característico a forma poliarticular. Tipicamente os pacientes com AR apresentam, na articulação afetada dor pela manhã, tumefação, rubor e rigidez matinal prolongada, superior a 60 minutos.

É importante também reconhecer que a AR é uma doença sistêmica e que, portanto, além dos sintomas constitucionais e articulares, pode apresentar um envolvimento extra-articular, que por vezes precede os sintomas articulares. As manifestações extra-articulares mais frequentes são os nódulos reumatóides, que são formações nodulares subcutâneas, localizadas em áreas de pressão, como os cotovelos, dedos ou outras articulações. Outros envoltimentos sistêmicos que podem surgir são a fibrose pulmonar, derrame pleural, pericardite, vasculite, miosite, alteração neurológica, principalmente sintomas compressivos, anemia hipocrômica e microcítica, além, de ceratoconjuntivite seca que afeta aproximadamente 10 % dos pacientes, principalmente quando acompanhada da síndrome de Sjögren secundária. (16)

A evolução da doença é variável, alguns pacientes podem evoluir espontaneamente para a cura (autolimitada) ou apresentar leves deformidades, e em outros casos pode ser progressiva e grave com surgimento de deformidades articulares irreversíveis dos dedos (desvio ulnar), dedos em pescoço de cisne, dedo em martelo, subluxações, luxações e anquilose) complicações viscerais e óbito. (16, 51)

1.5 Diagnóstico e critério de classificação da artrite reumatóide

Em virtude da inexistência de um método diagnóstico específico, foram estabelecidos critérios de classificação para a uniformização do diagnóstico da AR pelo *American College of Rheumatology (ACR) em 1987*. Esses critérios foram utilizados como padrão para pesquisa, ensino e diagnóstico de AR por aproximadamente 30 anos. Essa composição demonstrou uma sensibilidade de 91,2% e uma especificidade de 89,3% para AR, quando comparada a outras doenças reumáticas e indivíduos normais. (52) O diagnóstico da doença depende da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiológicos. (14)

Critérios de classificação estabelecido pelo ACR -1987⁽⁵²⁾

1. Rigidez matinal nas articulações com duração mínima de uma hora;
2. Artrite de três ou mais articulações simultaneamente;
3. Artrite de mãos e punhos;
4. Artrite simétrica nas áreas acometidas;
5. Nódulos reumatóides;
6. Fator reumatóide positivo;
7. Alterações radiológicas características.

Os critérios de 1 a 4 devem estar presentes por pelo menos seis semanas, e quatro características devem estar presentes para se considerar o paciente portador de AR. Porém, é importante ressaltar que antes de se concluir por um diagnóstico de AR, devem-se excluir outras doenças que podem simular a enfermidade.

1.6 Características laboratoriais na artrite reumatóide

Os achados laboratoriais de uma doença como a AR, cuja etiologia é desconhecida e cujos mecanismos etiopatogênicos ainda são discutidos, carecem de especificidade, mas há habitualmente uma constelação de achados que em conjunto com a história clínica, exame físico e achados radiográficos permitem ao clínico experientado formular o diagnóstico.

Assim, pode ocorrer no hemograma, anemia normocítica e hipocrômica ou normocrômica, trombocitose, leucocitose, porém com contagem diferencial normal, encontrada nas formas mais ativas da doença. (51) As medidas de laboratório mais citadas para avaliar atividade da doença são a velocidade de hemossedimentação (VHS) e a proteína C reativa (PCR). A VHS reflete a atividade de algumas semanas (elevação e declínio lentos) e é influenciada por diversos fatores, como a idade, sexo e anemia, enquanto a PCR reflete mudanças de curto prazo e não sofre a mesma influência dos fatores citados, sendo mais sensível para mudanças na atividade da doença. (53)

Níveis elevados de PCR no início correspondem a um pior prognóstico e à doença erosiva progressiva. Há uma boa correlação da PCR com terapêutica e progressão radiológica, sendo melhor que o VHS. Entretanto, pode haver grande discordância entre resultados de VHS e PCR em até 28% dos pacientes, sendo os de pior estado clínico aqueles com PCR alta e VHS alta. Em seguida situam-se aqueles com PCR alta e VHS baixa, PCR baixa e VHS alta, PCR baixa/ VHS baixa, nesta ordem, quando considera avaliação de articulações acometidas, força, *Health Assessment Questionnaire (HAQ)* dor e gravidade global. (53)

Existe uma série de autoanticorpos que foram avaliados na AR, dentre eles os mais importantes são: o FR e ACPA, que foram descritos independentemente. Contudo, é importante ressaltar que nenhuma destas alterações laboratoriais tem valor diagnóstico isoladamente. No entanto, poliartrite, com VHS e /ou PCR aumentados com FR e ACPA positivos são uma situação que sugere com elevada probabilidade o diagnóstico de AR. A presença seja do FR ou ACPA aumenta a sensibilidade para a doença em 81,4%, e a presença de ambos demonstrou uma especificidade de 91,4 %. (54)

1.6.1 Fator reumatóide e o seu papel na artrite reumatóide

O FR, descrito há mais de 75 anos é um anticorpo dirigido contra a fração constante da IgG e encontra-se em todas as subclasses de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA). A sua especificidade é limitada já que pode ser encontrado em pacientes com outras doenças autoimunes, em 3 a 5 % de indivíduos saudáveis, e a sua frequência na população geral pode aumentar com a idade, sendo que 10 a 30% das pessoas maiores de 65 anos apresentam FR+. Embora não específico da AR está presente em 75 % dos pacientes com AR e é o marcador imunológico mais utilizado para o diagnóstico. De fato a sua presença é considerada como

critério de classificação da AR. (52) Goldbach-Manssky et al, descreveram uma especificidade de 87% e sensibilidade de 66 % para AR. (55)

A detecção do FR pode ser realizada pelos métodos de látex, ELISA e nefelometria. Saraux et al, demonstraram no estudo realizado em 270 pacientes com artrite reumatóide de início recente, que a determinação do FR pelos métodos de ELISA ou látex são úteis para apoiar o diagnóstico de AR. (56)

Em 2007, Lee et al, evidenciaram que o FR e ACPA estão fortemente influenciados pelo EC, tanto naqueles com um ou dois alelos EC, porém, com maior associação naqueles pacientes com dois alelos, sugerindo, o efeito dos genes na formação dos anticorpos. Porém, não afetam no valor do título do FR. Demonstraram também que o FR é significativamente maior nos pacientes tabagistas. (49) Recentemente, Balsa et al, confirmam que o FR e ACPA, estão fortemente associados com AR com OR 14,9; IC 95% 9,18-24,45 e OR 27,5; IC 95% 14,08 e 53,34 respectivamente. Observaram também que existe associação dose dependente dos alelos EC com os títulos do FR e ACPA. Porém, nenhum efeito do FR e alelos HLADRB1*DR3 e alelos DERA A foi observado, assim como não foi observado o efeito do título do FR com os alelos DR3 e DERA A. (36)

A presença do FR, assim, como títulos elevados, foi relacionada a pacientes com doença agressiva. (57)

1.6.2 ACPA e a sua relação com artrite reumatóide

Nos últimos anos, surgiu o interesse por uma série de autoanticorpos específicos para AR. Dentre eles o ACPA, que tem especificidade de 98 % e sensibilidade de 80% para AR, estes anticorpos pertencem à família de autoanticorpos contra o fator perinuclear. (58) O ACPA se liga a determinantes antigênicos que contêm um aminoácido inusitado, a citrulina, que é resultado de modificações pós-traducionais de proteínas contendo arginina catalisada pelas enzimas PADs processo que é denominado de citrulinização. (59) Por isso este grupo de autoanticorpos é conhecido como ACPA.

Nielen, et al em 2004, destacou que a presença destes anticorpos em indivíduos assintomáticos (doadores de sangue) que posteriormente desenvolveram AR; com um alto valor preditivo positivo (96,6%). Isso mostrou que o processo de citrulinização de proteínas, assim como a produção de anticorpos, acontece precocemente ao desenvolvimento da doença.

Os mesmos autores, observaram também que níveis elevados de ACPA e FR IgM estariam implicados com este risco. (60) O ACPA mostrou ainda ser um forte preditor de progressão na AR clássica, assim como, nas artrites indiferenciadas. (61) Por outro lado, vários estudos demonstram que estes anticorpos estariam também associados à gravidade da doença, sendo assim, por exemplo, Kroot et al, evidenciaram que pacientes com AR e ACPA tinham alteração radiológica mais grave comparada aos pacientes sem o anticorpo. (62) Um outro estudo publicado em 2006 informou que a presença do ACPA e do FR está independentemente associadas à gravidade da doença, e que os alelos EC teriam um papel secundário. Encontraram também que pacientes com ACPA + e FR+ apresentam escores de Larsen significativamente maiores quando comparado com pacientes com só um destes anticorpos positivos. (63) Mais recentemente, Churl Im et al, evidenciaram que a presença do ACPA está fortemente associada com a susceptibilidade para AR e a presença de erosão óssea, porém, estes autores referem que a associação foi independente da presença do EC ou FR. (64)

Outros autores mostraram que existe associação do ACPA com a presença de certos alelos HLA. Sendo assim, Hill et al, em 2003, encontraram associação entre a presença destes anticorpos e alelos HLA-DRB1*04:01 em AR, e mais tarde foi reportado a associação com os alelos HLA-DRB1*04:01*04:04, os mesmos que teriam um valor prognóstico para o desenvolvimento da AR. (65)

Kaltenhauser et al, em 2007 concluíram que em pacientes com AR apresentando simultaneamente ACPA e EC (alelos HLA-DRB1*04) existe associação com o aumento do escore radiológico de Larsen, enquanto que, pacientes com ACPA - e EC- apresentaram baixos valores. (66)

Por outro lado, um dos fatores que foi relacionado com o aumento do risco para o desenvolvimento da AR é o uso de tabaco. Klareskog et al, observaram correlação entre a presença dos alelos HLA-DRB1*04:01 e o ACPA em pacientes com AR tabagistas. O risco relativo de desenvolver AR e a presença deste anticorpo é 21 vezes maior para os pacientes que fumam com o alelo HLA-DRB1*04:01 comparado aos não fumadores e sem o alelo. (67)

Porém, um outro artigo refere que a associação entre a citrulinização de proteínas no pulmão de tabagistas e o início da resposta imune contra estas proteínas em AR, poderia não ser exclusivo dos fumantes. (68) Foi reportado também que, a exposição a outras substâncias contaminantes, pode causar dano ao tecido pulmonar, provocando liberação de PADs, e conseqüentemente aumento da citrulinização de proteínas, que em indivíduos geneticamente predispostos incrementaria o risco de desenvolver autoimunidade. (69)

1.7 Avaliação radiológica

A radiografia convencional é uma valiosa ferramenta na abordagem e seguimento da AR. Têm diferentes utilidades, entre elas: aproximação diagnóstica, avaliação da alteração estrutural, medição da gravidade e progressão, assim como medir de forma objetiva o acometimento articular e avaliar a efetividade da terapia estabelecida. Sugere-se estudar radiografias das mãos e pés no início da doença com seguimento anual. Se a doença persistir ativa, sugere-se avaliar a alteração estrutural a cada 6 meses. (70)

A radiografia simples, apesar de ser o exame de referência para a avaliação do dano articular (erosões ósseas, redução de o espaço articular, osteopenia periarticular, subluxações, luxações, cistos subcondrais ou anquilose) e da sua progressão, pode não fornecer informações diagnósticas suficientes em um estágio inicial, já que é necessário ocorrer perda substancial do osso para ser radiograficamente detectável. (71)

Alterações radiológicas como a presença de erosão ou osteopenia periarticular são um dos critérios de classificação do ACR para AR. (52) De todas as alterações radiográficas, as erosões e a perda do espaço articular são as que melhor refletem o processo fisiopatológico do dano articular na AR, motivo pelo qual foram utilizadas na maioria dos estudos e quantificadas em escores de sistemas de pontuação validados para classificar o grau de alteração estrutural que gerado pela doença na articulação. O método de classificação mais comum para avaliar o dano articular e progressão radiológica é o escore de Sharp modificado de Van Der Heijde, que avalia 16 áreas na mão para erosão e 15 áreas para redução dos espaços articulares. A pontuação máxima para erosão na mão é de 160 e para redução do espaço articular 120. Nos pés a pontuação para erosão é de 120 e 48 para redução do espaço articular. (72) Tabela 2.

Tabela 2 - Pontuação de erosões e diminuição dos espaços articulares segundo o método de Sharp – Van Der Heijde (72)

Pontos	Redução de o espaço articular	Erosão óssea
0	Sem Redução	-
1	Redução focal ou duvidosa	Discreta
2	Generalizada (Respeita >50% do espaço original)	Maior
3	Generalizada (Respeita <50% do espaço original) ou Subluxação	Estende-se mais da metade imaginária óssea
4	Anquilose ou subluxação completa	Erosões em 4 quadrantes
5	-	5 ou mais erosões

1.8 Fatores de mau prognóstico

Os pacientes portadores de AR com características de um prognóstico desfavorável possuem doença ativa com contagens de articulações sensíveis e edemaciadas, frequentemente com evidências de erosões radiográficas, níveis elevados de FR e ou ACPA, uma taxa elevada de VHS e ou PCR. Idade avançada, sexo feminino, genótipo (epítipo compartilhado HLA-DRB1 e alelos S2 E S3P), funcionamento físico piorado com base em pontuação obtida pelo HAQ e tabagismo são também importantes indicadores para um pior resultado em AR, progressão radiográfica, incapacidade precoce e morbidade (como risco aumentado da necessidade de substituição de articulação). (73)

2 JUSTIFICATIVA

Embora a causa da AR ainda seja desconhecida, sua etiologia é multifatorial e o componente genético, principalmente o HLA, influencia o desenvolvimento da doença em 50% dos casos.

Diversos estudos imunogenéticos, realizados em populações de etnias distintas, mostraram diferenças dos alelos HLA-DRB1 implicados na susceptibilidade da AR. No Brasil, além de haver poucos estudos sobre HLA e AR, os existentes têm amostras pequenas e a maioria realizada em pacientes caucasóides. Sendo a população brasileira caracteristicamente miscigenada, estes estudos podem não ser representativos da população como um todo.

O atual estudo pretende contribuir com a identificação e compreensão da associação do polimorfismo do HLA-DRB1 nos pacientes brasileiros com AR.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Determinar a frequência de diferentes alelos HLA-DRB1 nos pacientes com AR do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e do Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo.(UNIFESP)

3.2 Objetivo secundário

Estudar as associações entre os diferentes alelos do HLA-DRB1 com os auto-anticorpos, fator reumatóide e ACPA, e o escore radiográfico de Sharp modificado de Van Der Heijde.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo caso-controle que avalia a frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com AR e numa população controle sem AR, pareada para sexo e etnia.

4.1.1 População de estudo

4.1.1.1 Pacientes com artrite reumatóide

Os pacientes com AR, cujo diagnóstico foi estabelecido de acordo com os critérios do ACR revisados em 1987, (52) foram selecionadas dentre 600 pacientes acompanhados regularmente nos ambulatórios de artrite reumatóide da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), e dentre aproximadamente 650 pacientes do Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), de outubro 2007 a agosto de 2009.

As inclusões foram sequenciais, de acordo com a data de consulta regular nesses ambulatórios, até que o número suficiente de casos fosse atingido de acordo com cálculo estatístico indicativo prévio.

Após serem informados sobre a natureza do estudo e terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) os pacientes incluídos foram submetidos à entrevista da pesquisa com questionário semiestruturado para registrar informações gerais, dados demográficos, avaliação clínica da doença e tempo da doença (Apêndice B). No mesmo dia, foram revisados também os prontuários para verificar o diagnóstico, realizado exame físico dos pacientes, coletado sangue venoso periférico para

tipificação do HLA-DRB1, determinação de ACPA e FR e solicitadas radiografias de mãos e pés para determinação do escore de Sharp modificado de Van Der Heijde. Quando necessário foi feito contato telefônico para confirmação de dados referentes aos questionários empregados.

Foram excluídos os pacientes com outras doenças autoimunes associadas a AR, com exceção da síndrome de Sjögren secundária, pacientes com diagnóstico de provável AR, pacientes que não sabiam a ascendência dos pais ou avós biológicos, assim como, os que não concordaram em participar do estudo ou não assinaram o TCLE previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPE.

4.1.1.2 Grupo controle

No grupo controle, foram incluídos indivíduos doadores voluntários de medula óssea, de campanhas de doação realizadas em diferentes bairros do Rio de Janeiro, de maio de 2008 a novembro de 2009. Eram de ambos os gêneros e não apresentavam queixa atual ou passada de artrite. Também não foram incluídas pessoas com história familiar de AR ou outras doenças autoimunes em parentes de primeiro grau. Foram selecionados os maiores de 30 anos, para minimizar o viés de análise quanto ao possível diagnóstico futuro dessa doença neste grupo.

Após serem informados sobre a natureza do estudo e terem assinado o TCLE (Apêndice C), todos os selecionados para o grupo controle foram entrevistados com questionário também semi-estruturado, que incluiu aspectos sócio-demográficos, caracterização da etnia, história familiar e queixas articulares (Apêndice D). No mesmo dia, foram submetidos a coleta de sangue venoso periférico para tipificação do HLA-DRB1 que foi encaminhado para o laboratório de HLA e criopreservação da UERJ.

Os critérios de exclusão no grupo controle foram: idade menor que 30 anos, pessoas com doenças autoimunes ou com história familiar de AR ou outras doenças autoimunes em parentes de primeiro grau, assim como, pessoas que tinham ou tenham tido artralguas ou artrite, e doadores que não conheciam dados de ascendência de avós ou pais e pessoas que não concordaram em participar do estudo.

Em ambos os grupos foram excluídos os indivíduos que não possuíam quantidade de DNA ou soro suficientes para uma adequada análise do HLA ou dosagem dos autoanticorpos.

Também não foram incluídas pessoas cuja tipificação mostrou resultado ambíguo, assim como, descendentes de asiáticos com a finalidade de evitar viés de seleção.

A atribuição da origem étnica em ambos os grupos foi realizada pelo mesmo investigador após solicitar aos pacientes e doadores voluntários dados sobre sua ascendência. Foi considerado de etnia negra ou caucasóide aquele indivíduo com os quatro avôs com ascendência negra ou caucasóide, respectivamente, e mestiço quando, pelo menos, um dos avós era de etnia diferente. (74) Em caso de desconhecimento de dados dos avós foram considerado dados dos bisavôs e pais.

4.2 Procedimentos

4.2.1 Detecção do DNA e do polimorfismo de HLA-DRB1

Cinco mililitros (mL) de sangue periférico foram coletados de cada paciente em tubo com EDTA e armazenados numa temperatura de -20° C. Os procedimentos foram realizados no laboratório de HLA da UERJ.

4.2.1.1 Extração do DNA

Para obtenção de DNA genômico foi usado o **“GFX™ Genomic Blood DNA purification kit”– AmershamPharmacia biotech** - seguindo as instruções do fabricante.

Em um tubo de 1,5mL, adicionar 500µl de sangue total e em seguida 900µl de solução de lise. Incubar por 5 min em temperatura ambiente. Centrifugar em velocidade máxima (de 12.000 a 16000rpm) por 30 segundos em centrífuga para microtubos, refrigerada a 4° C (todas as centrifugações foram realizadas nesta temperatura). Aspirar o sobrenadante com cuidado. Ressuspender o sedimento por vortex vigoroso no sobrenadante residual (aproximadamente 20-50µl).

1. Adicionar a esta suspensão 500µl da solução de extração e misturar imediatamente por vortex.
2. Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente.
3. Transferir a mistura para a coluna GFX previamente encaixada em 1 tubo coletor.
4. Centrifugar a 4°C, a 8.000rpm por 1 minuto.
5. Descartar o material que passou pela coluna.
6. Adicionar 500µl da solução de extração à coluna e centrifugar a 8.000rpm por 1 minuto.
7. Descartar o material que passou pela coluna.
8. Adicionar 500µl da solução de lavagem à coluna e centrifugar em velocidade máxima (13.000rpm) por 3 minutos.
9. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um novo tubo de 1,5mL.
10. Adicionar 200µl de água bidestilada e autoclavada pré-aquecida a 70°C. Aplicar diretamente no centro da coluna (sem tocar na membrana).
11. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
12. Centrifugar a 8.000rpm por 1 minuto. Quantificar o DNA obtido pela leitura em espectrofotômetro a 260nm.

4.2.1.2 Tipificação dos grupos de alelos HLA-DRB1

A tipificação HLA foi realizada pela reação em cadeia de polimerase (PCR) usando *primers* específicos e hibridização com oligonucleotídeos de sequência específica (SSOP) (One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA)

1. PCR-SSO (*Sequence Specific Oligonucleotide*)

O princípio LABType® SSO aplica a tecnologia Luminex® ao método de tipificação do HLA. Inicialmente, o DNA é amplificado utilizando *primers* grupo-específicos. O produto de PCR é biotilado, o que permite que ele seja posteriormente detectado utilizando estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina (SAPE).

Em seguida, o produto de PCR é desnaturado e, então, hibridizado a pequenas sondas (seqüências complementares), que por sua vez estão conjugadas a microesferas fluorescentes.

Cada sonda específica está conjugada a uma esfera com endereço cromático próprio. Um analisador de fluxo, LABScan™ 100, identifica o endereço cromático e a intensidade da fluorescência da PE (ficoeritrina) em cada microesfera.

Amplificação

Para cada reação foram utilizados 6,9µl de solução D-mix, 2,0µl de *primers* a 10mM e 0,1µl de Taq DNA polimerase 5U/µl (Invitrogen). As amplificações foram realizadas utilizando aparelho termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) e o programa descrito a seguir:

Nº de ciclos	Passos	Temperatura	Tempo (seg)
1	1	96°C	180
5	3	96 °C	20
		60 °C	20
		72 °C	20
30	3	96 °C	10
		60 °C	15
		72 °C	20
1	1	72 °C	10min

Parte do produto amplificado (1,5µl) foi submetido a eletroforese em gel de agarose.

Eletroforese e visualização do gel

Para realizar a eletroforese dos produtos amplificados foi utilizado gel de agarose a 2% preparado em tampão TBE (5,4g Tris-base; 2,75g de ácido bórico; 2mL de solução de EDTA 0,5M; água destilada até completar 1 litro) com 0,75µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen). Utilizou-se a cuba Micro SSP Gel System (*One Lambda, Canoga Park, CA, USA*) para submeter o gel à eletroforese durante 6 minutos a aproximadamente 150 V.

As bandas de material amplificado foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas através do sistema de documentação de imagem de gel de eletroforese (*Kodak Digital Science - Electrophoresis Documentation and Analysis System 120; Eastman Kodak Company, NY, USA*).

Desnaturação e neutralização

Após a confirmação da presença de produto de amplificação (banda), foram transferidos 2,5µl do material amplificado para uma placa de PCR e adicionados 1,25µl de tampão de desnaturação. Após incubação por 10 minutos, foram adicionados 2,5µl de tampão de neutralização.

Hibridização

Ao produto desnaturado e neutralizado, foram adicionados 19µl de solução de hibridização (17µl de tampão de hibridização e 2µl de microesferas), seguindo-se incubação à 60°C por 15 minutos. A seguir foram adicionados 50µl de tampão de lavagem, seguido de centrifugação a 1000 – 1300g (~2500rpm) a 4°C por 5 minutos. A placa foi invertida para a eliminação do sobrenadante e esta etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes.

Marcação

Após as lavagens, foram adicionados 25µl da mistura SAPE (0,25µl de SAPE + 24,75µl de tampão SAPE) e a placa foi incubada a 60°C por 5 minutos. Foi realizada mais uma etapa de lavagem como descrito acima e o tampão foi removido invertendo a placa. O sedimento de microesferas foi ressuspenso em 65µl de tampão de lavagem e o conteúdo transferido para uma placa de leitura, modelo ELISA.

Leitura

A placa de ELISA com o material hibridizado foi levada a uma plataforma XY, acoplada ao aparelho *LABScan 100 luminex*, que detectou as fluorescências emitidas pelas microesferas.

A interpretação dos resultados obtidos no luminex foi realizada por um software (HLA Visual 2.1 – One Lambda, Inc), que analisa as microesferas com hibridação positiva na amostra, compara com uma planilha de padrões fornecida pelo fabricante e estabelece a tipificação HLA

2. PCR-SSP (sequence specific primers)

Os kits SSP são constituídos por tubos de solução D-mix e placas para PCR contendo *primers* (seqüências de oligonucleotídeos) específicos liofilizados.

No tubo correspondente ao controle negativo utilizou-se 1µl de água bi-destilada no lugar de DNA. Ao tubo D-mix foi adicionado 1,5µl de Taq DNA Polymerase 5U/µl (Invitrogen) e 28µl de DNA para tipificação de HLA-DRB1. Após homogeneização, 10µl foram distribuídos em cada tubo de reação.

As ampliações foram realizadas utilizando aparelho termociclador GeneAmp 9700 (*Applied Biosystems*) e o programa descrito a seguir:

Nº de ciclos	Passos	Temperatura	Tempo (seg)
1	1	96°C	130
	2	63°C	60
9	1	96°C	10
	2	63°C	60
20	1	96°C	10
	2	59°C	50
	3	72°C	30

Ao final do programa as amostras foram conservadas a 4°C até o momento da realização da eletroforese.

4.2.1.3 Interpretação dos resultados

Uma banda controle interna deve ser visível em todas as raias (exceto no controle negativo) como controle de amplificação bem sucedida. O *primer* do controle interno amplifica uma região do gene de β -globina e apresenta massa molecular de 750pb.

As bandas do grupo de alelos DRB1* são identificadas como bandas de massa molecular menor se comparadas com a banda do controle interno, e variam de 75 a 325pb. A presença dessas bandas indica resultado positivo do teste.

Comparando-se as raias que derem resultado positivo com a planilha de padrões de tipificação fornecida pelo fabricante, chega-se ao resultado da tipificação do HLA. Posteriormente, a sequência de aminoácidos nas posições 70 -74 de cada alelo foram pesquisadas no banco de dados localizados nos seguintes sítios:

- [www.http//bioinformatics.nmdp.org/HLA/Allele_CodesDNA_type_lookup/dn_atyp.pl?locus=DRB1&dna=DRB1*04AFMT](http://bioinformatics.nmdp.org/HLA/Allele_CodesDNA_type_lookup/dn_atyp.pl?locus=DRB1&dna=DRB1*04AFMT)
- [www.http//ebi.ac.uk/imgt/hla](http://ebi.ac.uk/imgt/hla)

Definição dos alelos HLA-DRB1 de risco para AR

Todo indivíduo que apresentou tipificação para os seguintes alelos HLA-DRB1 *01:01, *01:02, *04:01, *04:04, *04:05, *04:08, *04:10, *10:01 e *14:02 foi considerado portador do epítopo compartilhado portadores dos aminoácidos (QKRAA/QRRAA/RRRAA) na posição 70 a 74 (EC+), podendo ser em uma dose (EC +/-) ou dupla dose (EC +/+). Associações de risco para AR entre alelos HLA-DRB1 foram realizadas a partir de combinações genóticas estabelecidas na ausência de EC (-/-), na presença de uma dose do EC (+/-) ou de dose dupla do EC (+/+). A associação do HLA-DRB1 com as características sorológicas nos pacientes com AR também foi realizada.

Definição dos alelos HLA-DRB1 de proteção para AR

Todo indivíduo que apresentou tipificação para os alelos HLA-DRB1 *01:03, *04:02, *11:02, *11:03, *13:01, *13:02 e *13:04 foi definido como portador da sequência DERAA (protetora), podendo ser em uma dose ou em dose dupla.

Os indivíduos cuja tipificação compreendia alelos não pertencentes à sequência do epítopo compartilhado ou a sequência DERAA, foram definidos com X, podendo estar em uma dose ou em dupla dose.

Assim, formaram-se seis grupos de indivíduos para análise, de acordo a presença dos alelos DRB1:

Grupo A: dupla dose (homozigotos) para EC (EC/EC);

Grupo B: única dose (heterozigoto) alelo EC (EC/X);

Grupo C: presença de única dose de EC e única dose do DERAA (EC/DERAA);

Grupo D: ausência de EC e DERAA (X/X);

Grupo E: presença única dose do DREAA (DERAA/X);

Grupo F: presença de dupla dose do DERAA (DERAA/DERAA).

Definição dos alelos HLA-DRB1 de acordo a classificação de Du Montcel

Os alelos foram classificados seguindo a proposta por Du Montcel, todos os indivíduos foram considerados portadores de:

Alelos S2: quando presente aminoácidos QKRAA ou DKRAA nas posições 70 a 74.

Alelos S3D: quando presente aminoácidos DRRAA nas posições 70 a 74.

Alelos S3P: quando presente aminoácidos QRRAA ou RRRAA nas posições 70 a 74.

Alelos S1: quando presente aminoácidos QARAA ou DERAA nas posições 70 a 74.

Alelos X: todos os portadores sem aminoácidos RAA na posição 72 a 74. Resultando, por tanto, de acordo com esta nova classificação cinco alelos HLA-DRB1 S1, S2, S3P, S3D e X.

4.2.2 Avaliação de FR, ACPA

Cinco mL de sangue periférico foram coletados de cada paciente para determinação do FR e ACPA e armazenados a -20° C. Procedimentos que foram executados no laboratório Sérgio Franco Medicina Diagnóstica – DASA do Rio de Janeiro.

A detecção do ACPA foi realizada empregando o QUANTA Lite™ 2nd generation CCP ELISA (INOVA Diagnostics, Inc – San Diego-USA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram considerados positivos valores maiores que 20UI/mL, sendo considerado fracamente reativo valores entre 20 e 39 UI/mL, moderadamente reativo entre 40 e 59 UI/mL e fortemente reativo quando o valor for maior a 59 UI/mL.

A quantificação de FR IgM foi realizada pela técnica de nefelometria (Dade Behring Marburg GmbH – *Germany*). Valores maiores que 20 UI/mL foram considerados alterados em ambos os casos.

4.2.3 Avaliação radiográfica

Exames radiográficos das mãos e pés nas incidências posteroanterior (PA) e anteroposterior (AP), respectivamente, foram avaliados no grupo de pacientes com AR. Todas as radiografias foram analisadas por um mesmo radiologista com larga experiência em doenças osteoarticulares, utilizando o método de Sharp modificado Van Der Heijde e sem o conhecimento do estado clínico e do estudo genotípico do paciente.

Para a avaliação da mão, o escore máximo previsto para erosão é de 160 e para redução do espaço articular é de 120, sendo o escore total de 280 (160+120). Para os pés, o escore máximo para erosão é de 120 e para redução do espaço articular de 48 (total = 168). Desta forma, o escore máximo do Escore de Sharp modificado, somando mãos e pés é de 348.

Análise de possíveis associações deste parâmetro com alelos HLA-DRB1 foram posteriormente realizadas, com a finalidade de identificar pacientes com formas mais agressivas da AR de acordo ao tempo de doença, e os mesmos foram classificados em 4 grupos:

- a) Grupo 1: paciente com menos de 2 anos de diagnóstico.
- b) Grupo 2: pacientes com diagnóstico entre 2 a 5 anos.
- c) Grupo 3: pacientes com diagnóstico entre 5 a 10 anos.
- d) Grupo 4: pacientes com diagnóstico há mais de 10 anos.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se o programa EpiInfo 6. A análise da associação (*odds ratio=OR*) entre as variáveis categóricas, incluindo os alelos de HLA-DRB1 segundo a hipótese do EC e classificação de Du Montcel com o FR, ACPA, foi feita pelo teste do qui-quadrado (com correção de Yates em tabela 2x2) ou teste exato de Fisher. Análise de regressão logística foi utilizada para categorizar o risco de associação dos alelos HLA-DRB1. Variáveis quantitativas com distribuição normal foram avaliadas com o emprego do teste t de student para determinação de igualdade entre os valores obtidos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney (bi caudal) foi empregado para avaliação de igualdade entre os dados para as variáveis sem distribuição normal. O teste do qui-quadrado, incluindo correção de Yates quando indicado pelo tamanho da amostra, foi empregado para testar a hipótese de homogeneidade das proporções referente aos dados de idade e etnia. Para as variáveis contínuas com distribuição normal, os valores foram apresentados como médias e desvio padrão (DP). Para as variáveis contínuas com distribuição não normal, os valores foram apresentados como medianas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, com o emprego de até três casas decimais.

6 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Todos os pacientes e voluntários foram previamente esclarecidos sobre a natureza do projeto. Todos concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A e C).

O atual protocolo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HUPE-UERJ sob o Nº. de registro é 2169/2008 e encaminhado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, por pertencer à área temática “Genética”.

7 RESULTADOS

Neste estudo foram inicialmente entrevistados 430 pacientes com AR, dos quais 206 pacientes eram acompanhados no ambulatório de AR do Hospital Universitário Pedro Ernesto -UERJ e 224 no ambulatório do Hospital São Paulo - UNIFESP. A entrevista, avaliação clínica e coleta de material para tipificação do HLA foram realizadas de outubro de 2007 a agosto de 2009. Dentre os 430 pacientes entrevistados, 18 foram consideradas perdas pelas seguintes razões: sete pacientes por apresentar tipificação com resultados ambíguos, não tendo sido possível a obtenção de novo material, três que apresentavam material insuficiente para caracterização dos anticorpos e oito pacientes por material insuficiente para tipificação do HLA.

No grupo controle, foram entrevistados inicialmente 270 indivíduos doadores voluntários de medula óssea, de campanhas de doação realizadas em diferentes bairros do Rio de Janeiro, de maio de 2008 a novembro de 2009, dos quais 55 foram consideradas perdas pelas seguintes razões: trinta foram excluídos porque as amostras coletadas para tipificação foram encaminhadas por engano para outra instituição parceira nas campanhas de doação de medula óssea (HEMORIO) e não foi possível obter os resultados de tipificação. Cinco por presença de queixa articular atual, quatro por apresentar história familiar de doença autoimune, dois por desconhecimento dos dados ancestrais, quatorze por amostra insuficiente e apresentar tipificação com resultado ambíguo.

O grupo de pacientes com AR ficou, portanto, constituído por 412 (95%) pacientes, 204 do HUPE e 208 pacientes da UNIFESP. O grupo controle com 215 (79%) indivíduos doadores voluntários de medula óssea.

7.1 Características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes com AR e controles

A idade dos pacientes do HUPE - UERJ na época de inclusão no estudo, variou entre 21 a 76 anos, teve como média $50,2 \pm 12,12$ e mediana de 51,5 anos. Cento e cinquenta e um (74%) eram de etnia mestiça, 18 (8,8%) negra e 35 (17,2%) branca, 178 (87,3 %) eram do sexo feminino, e a média do tempo da doença era de $6,8 \pm 6,3$ anos.

No grupo de pacientes do hospital São Paulo – UNIFESP a idade variou entre 25 e 88 anos, a idade média foi de $53,5 \pm 10,6$ e a mediana de 53 anos. Cento e noventa e oito (94,3%) eram do gênero feminino, foram classificados como de etnia mestiço 121 (58,2%) pacientes, 76 (36,5%) branca e 11 (5,3%) da etnia negra, a média do tempo da doença neste grupo era de $11,6 \pm 8$ anos.

A idade no grupo total de pacientes variou entre 21 a 88 anos, com média de $51,8 \pm 11,5$ e mediana de 52,5 anos. Em relação à etnia 272 (66%) eram mestiços, 111 (27%) brancos e 29 (7%) negros. Trezentos e setenta e seis (90,8%) eram do gênero feminino.

No grupo controle a idade variou entre 30 a 54 anos, com média de $43,2 \pm 5,6$ e mediana de 43 anos. Foram classificados como de etnia mestiça 147 (68,4) indivíduos, 58 (27%) brancos e 10 (4,7%) considerados de etnia negra. Cento e noventa e oito (92,1%) eram do gênero feminino.

As características de sexo e etnia foram similares em ambos os grupos ($p=0,722$ e $p=0,55$). Detalhes das características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com AR e do grupo controle encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização demográfica e clínico laboratorial de pacientes com artrite reumatóide e controle

Variável	AR (n=412)	Controles (n=215)	P
Idade (anos), média \pm DP / mediana	$51,8 \pm 11,5$ / 52,5	$43,2 \pm 5,6$ / 43	< 0,001
Sexo: Feminino (%)	376 (90,8)	198 (92,1)	0,722
Etnia:			
Mestiços (n / %)	272 (66)	147(68,4)	0,552
Branco (n / %)	111 (27)	58 (27)	
Negros (n / %)	29 (7)	10(4,7)	
Tempo de doença, média anos \pm DP	$9,2 \pm 7,5$	-	
Fator Reumatóide + (n / %)	257 (62,5)	-	
Titulação do FR (UI/mL), média \pm DP	288 ± 668	-	
ACPA 2 + (n / %)	294(71)	-	
Titulação (UI/mL), média \pm DP	$135 \pm 51,5$	-	
ACPA 3 + (n / %)	309 (74,6)	-	
Titulação (UI/mL), média \pm DP	$181,9 \pm 62$	-	
Escore de Sharp, média \pm DP	$95,28 \pm 75,23$	-	

Artrite reumatóide (AR), anticorpo anti-peptídeo citrulinado (ACPA), Fator reumatóide (FR), $P < 0,5$

7.2 Associação de alelos HLA – DRB1 com artrite reumatóide

A tabela 4 mostra a distribuição das frequências de grupos alélicos do HLA-DRB1 (baixa resolução) e a associação com a susceptibilidade e proteção para AR entre 412 pacientes com AR e 215 voluntários do grupo controle. Alelos HLA-DRB1*04 (OR 2,69; IC 95% 1,86-3,92; $p < 0,001$), *09 (OR 5,19; IC 95% 1,50-21,49; $p = 0,004$) e *14 (OR 2,26; OR 2,26; IC 95% 1,04-5,09; $p = 0,038$) estiveram associados com a susceptibilidade à AR, enquanto que os alelos DRB1*11 (OR 0,45; IC 95% 0,30-0,68; $p < 0,001$) e *13 (OR 0,5 IC 95% 0,37-0,75; $p < 0,001$) estiveram associados com proteção ao desenvolvimento da AR ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Frequência dos grupos alélicos do HLA-DRB1 (baixa resolução) em pacientes com artrite reumatóide e grupo controle

Alelos HLA-DRB1	AR - 412 n(%)	Controles - 215 n(%)	OR	95 % IC	P
DRB1*01	113 (14)	45 (10,5)	1,36	0,93 – 2,00	0,119
DRB1*03	73 (9)	54 (12,5)	0,68	0,46 – 1,00	0,049
DRB1*04	186 (22,5)	42 (10)	2,69	1,86 – 3,92	0,001
DRB1*07	79 (9,5)	52 (12)	0,77	0,52 – 1,14	0,200
DRB1*08	38 (5)	20 (5)	0,99	0,55 – 1,79	0,912
DRB1*09	29 (3,5)	3 (1)	5,19	1,50 – 21,49	0,004
DRB1*10	27 (3)	14 (3)	1,01	0,50 – 2,04	0,882
DRB1*11	53 (6)	57 (13)	0,45	0,30 – 0,68	0,001
DRB1*12	12 (1,5)	9 (2)	0,69	0,27 – 1,79	0,547
DRB1*13	85 (10)	77 (18)	0,53	0,37 – 0,75	0,001
DRB1*14	38 (5)	9 (1)	2,26	1,04 – 5,09	0,038
DRB1*15	64 (8)	43 (10)	0,76	0,50 – 1,16	0,216
DRB1*16	27 (3)	11 (2,5)	1,29	0,61 – 2,80	0,595
TOTAL	824	430			

AR= Artrite reumatóide, OR Razão de Chance.

De forma semelhante, quando realizamos a tipificação dos alelos HLA-DRB1 por alta resolução (Tabela 5), a análise das frequências alélicas mostrou que alelos HLA-DRB1*01:01,*01:02,*04:01,*04:04,*04:05 estão presentes numa frequência maior nos

pacientes com AR do que no grupo controle. Desses os alelos DRB1*04:01 (OR 2,76; IC 95% 1,23-6,44; p= 0,010), *04:04 (OR 3,80; IC 95% 1,53-10; p=0,002), *04:05 (OR 2,60; IC 95% 1,25-5,53; p= 0,007) e *09:01 (OR 5,19; IC 95% 1,50-21,49; p= 0,004) estiveram associados com susceptibilidade à AR (p<0,05).

Tabela 5 - Frequência alélica do HLA-DRB1 em pacientes com artrite reumatóide e grupo controle

Alelos HLA-DRB1	AR - 824 n(%)	Controles - 430 n(%)	OR	95 % IC	Valor p
DRB1*01:01	68 (8,3)	26 (6)	1,40	0,86 - 2,29	0,195
DRB1*01:02	41 (5)	17 (4)	1,27	0,69 - 2,36	0,498
DRB1*01:03	4 (0,5)	2 (0,5)	1,04	0,16 - 8,22	0,702
DRB1*03	73 (8,8)	54 (12,5)	0,68	0,46 - 1,00	0,049
DRB1*04:01	41 (5)	8 (1,9)	2,76	1,23 - 6,44	0,010
DRB1*04:02	14 (1,7)	5 (1,2)	1,47	0,49 - 4,70	0,621
DRB1*04:03	9 (1,1)	5 (1,2)	0,94	0,29 - 3,23	0,864
DRB1*04:04	42 (5)	6 (1,4)	3,80	1,53 - 10,0	0,002
DRB1*04:05	48 (5,8)	10 (2,3)	2,60	1,25 - 5,53	0,007
DRB1*04:06	3 (0,4)	1(0,2)	1,57	0,15 - 39,2	0,892
DRB1*04:07	7 (0,8)	3 (0,7)	1,22	0,28 - 5,97	0,962
DRB1*04:08	12 (1,5)	0 (0,0)	ND	ND	0,027
DRB1*04:10	3 (0,4)	0 (0,0)	ND	ND	0,519
DRB1*04:11	7 (0,8)	4 (0,9)	0,91	0,24 - 3,72	0,862
DRB1*07	79 (9,6)	52 (12,1)	0,77	0,52 - 1,14	0,200
DRB1*08	38 (4,6)	20 (4,7)	0,99	0,55 - 1,79	0,912
DRB1*09:01	29 (3,5)	3 (0,7)	5,19	1,50 - 21,49	0,004
DRB1*10:01	27 (3,3)	8(1,9)	1,79	0,77 - 4,31	0,205
DRB1*11	53 (6,4)	57 (13,2)	0,45	0,30 - 0,68	0,001
DRB1*12	12 (1,4)	9 (2,1)	0,69	0,27 - 1,79	0,547
DRB1*13	85 (10,3)	77(17,9)	0,53	0,37 - 0,75	0,001
DRB1*14:01	20(2,4)	6(1,4)	1,76	0,66 - 4,92	0,313
DRB1*14:02	18 (2,2)	3 (0,7)	3,18	0,88 - 13,63	0,086
DRB1*15	64 (7,8)	43(10)	0,76	0,50 - 1,16	0,216
DRB1*16	27 (3,3)	11 (2,6)	1,29	0,61 - 2,80	0,595

AR= Artrite reumatóide, OR Razão de Chance.

7.3 Associação dos alelos HLA-DRB1 do epítipo compartilhado na suscetibilidade à artrite reumatóide

A Tabela 6 mostra a distribuição de pacientes com AR e indivíduos do grupo controle de acordo com a presença dos alelos HLA-DRB1 EC+. Observamos uma maior frequência de genótipos heterozigotos (51%) do que homozigotos (11%) no grupo de pacientes, estando ambos associados à susceptibilidade à AR (OR 2,90; IC 95% 1,99-4,23; $p < 0,001$ e OR 2,27; IC 95% 1,11-4,77; $p = 0,023$ respectivamente). Dentre os genótipos HLA-DRB1 EC heterozigotos os mais representativos foram: o HLA-DRB1*01:01, *01:02, *04:05, *04:01, *04:04 (12%, 8%, 8%, 6%, 6%), embora associação estatisticamente significativa tenham sido observadas somente com os genótipos HLA-DRB1*04:04 e *04:05 (OR 3,70; IC 95% 1,21-12,54; $p = 0,017$ e OR 2,76; IC 95% 1,15-6,94; $p = 0,020$). Enquanto que, dentre os genótipos homozigotos o mais representativo foi o HLA-DRB1*0101/*0401 presente em 8 (2%) dos pacientes. Por fim, observamos frequência aumentada do epítipo compartilhado no grupo de pacientes com AR (62,8%) quando comparados com os controles (31,1%), conferindo associação com a suscetibilidade à AR (OR 3,59; IC 95 % 2,49-5,17; $p < 0,001$).

A tabela 7 mostra a análise de regressão logística dos genótipos homozigotos e heterozigotos HLA-DRB1 EC+ quando comparado com genótipo sem o EC. Observamos risco aumentado para a doença de 3,86 vezes mais entre pacientes que apresentam genótipos homozigotos (IC 95% 1,84-8,24; $p < 0,001$) e de 3,54 vezes mais entre os que apresentam genótipos heterozigotos (IC 95% 2,40-5,21; $p < 0,001$).

Tabela 6 - Especificidades individuais de HLA-DRB1 associados à artrite reumatóide entre brasileiros de acordo com genótipos relacionados a presença do epítipo compartilhado

EC e genótipo	AR - 412 n(%)	Controles-215 n(%)	OR	95 % IC	P
Alelos EC+EC-	210 (51)	56 (26)	2,90	1,99 – 4,23	0,001
*01:01	48 (12)	18 (8)	1,44	0,79 – 2,65	0,257
*01:02	32 (8)	11 (5)	1,56	0,74 – 3,37	0,280
*04:01	23 (6)	6 (3)	2,06	0,78 – 5,74	0,167
*04:04	27 (6)	4 (2)	3,70	1,21 – 12,54	0,017
*04:05	35 (8)	7 (3)	2,76	1,15 – 6,94	0,020
*04:08	8 (2)	-	ND	-	0,092
*0410	3 (1)	-	ND	-	0,519
*10:01	21 (5)	7 (3)	1,60	0,63 – 4,20	0,392
*14:02	13 (3)	3 (1,5)	2,30	0,61 – 10,28	0,289
Alelos EC+EC+	45 (11)	11 (5)	2,27	1,11 – 4,77	0,023
*01:01 / *01:01	1 (0,2)	1 (0,4)	ND	ND	ND
*01:02 / *01:02	1 (0,2)	1 (0,4)	ND	ND	ND
*04:01 / *04:01	1 (0,2)	-	ND	ND	ND
*04:04 / *04:04	3 (1)	-	ND	ND	ND
*04:05 / *04:05	1 (0,2)	-	ND	ND	ND
*14:02 / *14:02	1 (0,2)	-	ND	ND	ND
*01:01 / *04:01	8 (2)	2 (1)	2,11	0,41 – 14,50	0,532
*01:01 / *04:04	3 (1)	-	ND	ND	ND
*01:01 / *04:05	3 (1)	2 (1)	ND	ND	ND
*01:01 / *10:01	2 (0,5)	-	ND	ND	ND
*01:02 / *04:01	2 (0,5)	-	ND	ND	ND
*01:02 / *04:04	3 (1)	1 (1)	ND	ND	ND
*04:01 / *04:05	3 (1)	1 (1)	ND	ND	ND
*04:01 / *10:01	2 (0,5)	-	ND	ND	ND
*04:05 / *10:01	2 (0,5)	-	ND	ND	ND
Outros	9 (2,2)	3 (1,5)	1,58	0,39 – 7,43	0,705
Total EC +	255 (62,8)	67 (31,1)	3,59	2,49 – 5,17	0,001

AR= Artrite reumatóide, OR Razão de Chance, EC = epítipo compartilhado

Tabela7 - Efeito da dose de alelos na susceptibilidade à artrite reumatóide em pacientes com AR entre brasileiros

Genótipo	AR = 412 n(%)	Controle = 215 n(%)	OR	95 % IC	p
EC+EC+	45 (10,9)	11 (5,1)	3,86	1,84 – 8,24	0,001
EC+EC-	210 (51,2)	56 (26)	3,54	2,40 – 5,21	0,000
EC-EC-	157 (37,9)	148 (68,8)	1,19 Ref	0,89 – 1,59	0,26

Razões de chance (OR) foram calculados em um modelo de regressão logística entre casos e controle como variável dependente, e o número de genes epítipo compartilhados (EC) como variável independente. Neste modelo, o estado negativo é o valor de referencia, com OR de 1,1, enquanto OR para os estados homozigotos e heterozigotos são relativos ao nulo.

7.4 Associação dos alelos HLA-DRB1-DERAA na proteção ao desenvolvimento da AR

Na tabela 8 observamos a influência dos alelos HLA-DRB1-DERAA na proteção para o desenvolvimento da AR. Setenta e nove (19%) dos pacientes com AR e 78 (36%) dos controles possuem os alelos de HLA-DRB1 codificando DERAA, indicando que a sua presença confere proteção para AR (OR 0,42; IC 95% 0,28-0,61; $p < 0,001$).

O efeito de alelos DERAA na ausência de alelos EC foi avaliado, comparando o grupo D (X/X) com o grupo E (X/DERAA) mais o grupo F (DERAA/DERAA). Indivíduos com DERAA positivo tiveram menor risco para desenvolver AR (OR 0,56; IC 95% 0,34-0,92; $p = 0,021$).

A comparação do grupo B (EC/X) com o grupo C (EC/DERAA) revelou que, na presença de um alelo EC, a codificação de alelos DERAA diminui o risco para a susceptibilidade para a AR, embora sem significância estatística (OR 0,60, IC 95% 0,28–1,29; $p = 0,216$).

Tabela 8 - Frequência de genótipos HLA-DRB1 de susceptibilidade (EC) e de proteção (DERAA) em pacientes com artrite reumatóide e grupo controle

Grupo	Genótipo DRB1	AR = 412 n(%)	Controle = 215 n(%)
A	EC+/EC+	45 (10,9)	11 (5,1)
B	EC+/X	175 (43,2)	42 (19,5)
C	EC/DERAA	35 (7,7)	14 (6,5)
D	X/X	110 (26,6)	84 (39,1)
E	X/DERAA	43 (10,4)	57 (26,5)
F	DERAA/DERAA	4 (0,9)	7 (3,3)

Alelos EC são HLA-DRB1 *01:01, *01:02, *04:01, *04:04, *04:05, *04:08, *10:01 e *14:02. alelos DERAAs são HLA-DRB1 *01:03, *04:02, *11:02, *11:03, *13:01, *13:02, e *13:04. X representa todos os outros alelos HLA - DRB1.

* OR, IC 95 % e valor P dos seguintes dados: Grupo B comparado com o C, OR 0,60 (IC 95% 0,28 – 1,29) P= 0,216, no grupo D comparado com o valor de E e F, OR 0,56 (IC 95% 0,34 – 0,92), P=0,021 e para o grupo A mais B comparado ao grupo D, OR 3,17 (IC 95% 2,05 – 4,90), P= 0,00.

7.5 Associação entre alelos HLA-DRB1 de susceptibilidade (EC) e presença de autoanticorpos

Os pacientes com AR apresentaram FR positivo em 62,3% (n=257) e ACPA positivo em 71,3% (n=294) dos casos, sendo que 237 (57,5%) dos pacientes foram positivos para ambos os autoanticorpos e somente 57 pacientes (13,8%) foram positivos apenas para o ACPA. Observamos também uma associação estatisticamente significativa entre o FR e ACPA (OR 20,79; IC 95 % 11,49-37,97; p<0,001).

Cento e sessenta e cinco pacientes (40,04%) expressavam FR+ e alelos HLA-DRB1 EC positivo, e 197 (47,81%) expressavam ACPA+ e alelos HLA-DRB1 EC positivos. Associação significativa foi observada somente para alelos EC com ACPA (OR 2,03; IC 95% 1,28- 3,31; p< 0,001) Tabela 9.

A titulação média do FR para o grupo de pacientes com genótipos EC homocigotos, heterocigotos e sem o EC foi de $177,7 \pm 286$ UI/ml, $205,3 \pm 695$ UI/ml e $157,1 \pm 328$ UI/ml

respectivamente e a titulação média para o ACPA seguindo a mesma ordem do FR foi de $131,3 \pm 66$, $102,8 \pm 71$ e $83,3 \pm 73$ respectivamente.

Os resultados também mostraram que níveis séricos médios altos do FR estavam presentes nos pacientes carregando alelos HLA-DRB1*01:02, *04:04, *04:08, *10:01 ($107,6 \pm 153,13$ UI/mL, $334,4 \pm 494,9$ UI/mL, $253,3 \pm 480,7$ UI/mL, $161,4 \pm 252,7$ UI/mL respectivamente). Enquanto que níveis séricos médios altos do ACPA estavam presentes nos pacientes com alelos HLA-DRB1*04:01, *14:02, *04:08, *04:04, *01:01 ($121,1 \pm 61,7$ UI/mL; $117,0 \pm 68,8$ UI/mL; $116,8 \pm 99,8$ UI/mL; $114,0 \pm 68,2$ UI/mL; $102,4 \pm 71,4$ UI/mL respectivamente), quando comparados aos pacientes que possuíam outros alelos de HLA-DRB1 EC+.

Tabela 9 - Frequência de alelos HLA - DRB1 epítipo compartilhados e autoanticorpos em 412 pacientes com artrite reumatóide

Autoanticorpos	EC+ n(%)	EC- n(%)	OR	95 % IC	p
Fator Reumatóide					
Positivo	165 (40,04)	92 (22,33)	1,26	0,82 – 1,94	0,313
Negativo	91 (22,08)	64 (15,53)			
ACPA					
Positivo	197 (47,81)	97 (23,54)	2,03	1,28 – 3,31	0,001
Negativo	59 (14,32)	59 (14,32)			

Epítipo compartilhado positivo (EC+), Epítipo compartilhado negativo (EC-), anticorpos anti-peptídeo citrulinado (ACPA), Razão de Chance (OR).

7.6 Relação do escore de Sharp modificado de Van Der Heijde e alelos HLA-DRB1 EC

Com a finalidade de identificar pacientes com formas mais agressivas de AR os 412 pacientes com a doença foram classificados em 4 grupos de acordo ao tempo de doença, 50 (12%) dos pacientes tinham menos de 2 anos de diagnóstico, 54 (13%) pacientes tinham entre 2 a 5 anos de doença, 190 (46%) entre 5 a 10 anos de doença e 118 (29%) apresentavam mais de 10 anos de diagnóstico.

Dos 412 pacientes incluídos neste estudo, 381 (92,5%) realizaram radiografias das mãos e pés nas incidências posteroanterior (PA) e anteroposterior (AP) respectivamente. Foram consideradas perdidas para avaliação radiográfica 31 (7,5%) pacientes, desses, 10 pacientes alegavam ter feito as radiografias solicitadas, porém teriam esquecido de trazer, e não foi possível recuperar essas radiografias, 8 referiam que não realizaram por incompatibilidade de horário do serviço de radiologia, e 13 pacientes não fizeram as radiografias por diversos outros motivos.

A tabela 10 mostra a distribuição dos genótipos de pacientes com AR classificados de acordo com a hipótese do EC, além, da média, mediana e desvio padrão do escore de Sharp modificado de Van Der Heijde. Observamos que quanto maior o tempo de evolução da artrite reumatóide maior a pontuação do escore de Sharp, independente da presença do EC. No entanto, é importante ressaltar que pacientes expressando alelos EC mostraram ter pontuação discretamente maior da mediana do escore de Sharp modificado nos quadro grupos ($14 \pm 30,2$; $58 \pm 48,4$; $78 \pm 63,3$ e $161,6 \pm 77,7$ versus $8 \pm 38,5$; 43 ± 44 $69 \pm 66,7$; $133 \pm 77,3$ respectivamente). Entretanto, a tabela 11 mostra que a pontuação da lesão articular e óssea não mostrou ser diferente entre os pacientes expressando alelos HLA-DRB1 com EC + e EC- ($p=0,717$), do mesmo modo, a presença de genótipos HLA-DRB1 EC homocigotos e heterocigotos também não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,382$).

Tabela 10 - Distribuição dos pacientes com artrite reumatóide de acordo com o tempo de doença, HLA-DRB1 EC e escore de Sharp modificado de Van Der Heijde

Tempo de AR	AR n°(%)	EC n°(%)	Escore de Sharp modificado de Van der Haijde					
			Rx lidas	Média	Mediana	Mín	Máx	DP
< de 2 anos	50 (11,2)	EC + 31 (64,6)	30	21,6	14	0	162	30,2
		EC - 17 (35,4)	16	25,2	8	2	126	38,5
2 a 5 anos	54 (13,1)	EC + 37 (68,5)	35	64,7	58	0	188	48,4
		EC - 17 (31,5)	16	53,5	43	10	153	44,3
5 a 10 anos	190 (46,6)	EC + 113(58,9)	107	91,6	78	0	379	63,3
		EC - 79 (41,1)	73	89,5	69	0	290	66,7
>de 10 anos	118 (28,6)	EC + 74 (62,7)	65	151,6	161	0	351	77,7
		EC - 44 (37,2)	39	149,2	133	17	328	77,3

EC= epítoto compartilhado, AR= artrite reumatóide, DP= desvio padrão, Rx = Radiografias

Tabela 11 - Distribuição dos pacientes com Artrite Reumatóide de acordo com o tempo de doença, HLA-DRB1 EC e escore de Sharp modificado de Van Der Heijde

HLA-DRB1	AR n(%)	Média	Mediana	Min	Máx	DP	p
EC+	236 (62)	95	77	0	379	76	0,717
EC-	145 (38)	93	75	0	328	75	
EC+EC+	183 (81)	87	65	0	290	73	0,382
EC+EC-	43 (19)	97	78	0	379	75	

EC= epítipo compartilhado, AR= artrite reumatóide, DP= desvio padrão. Teste não paramétrico de Mann - Whitney/Wilcoxon mostrou $p < 0,001$.

7.7 Associação com a suscetibilidade e proteção para AR dos alelos HLA-DRB1 segundo a classificação de Du Montcel et al

A tabela 12 mostra a distribuição das frequências dos grupos alélicos do HLA-DRB1 e a associação com a suscetibilidade e proteção para AR de acordo com a classificação proposta por Du Montcel et al (8) dos pacientes e voluntários do grupo controle. Dentre 824 alelos dos 412 pacientes com AR e 430 dos 215 do grupo controle, observamos frequência maior de alelos S2 55 (6,67%) e S3P 258 (31,3%) dentre o grupo de pacientes com AR, enquanto que no grupo controle foi menor 11 (2,55%) e 70 (12,27%) respectivamente. No entanto, no grupo controle observamos frequência maior de alelos S3D 67 (15,58%), S1 134(31,16%) e alelos X 148 (34,41%) quando comparado com o grupo de pacientes 89 (10,8%), 153 (18,56%) e 256 (32,16%) respectivamente. Associação estatisticamente significativa com a suscetibilidade à AR foi observada em pacientes com AR expressando alelos S2 (OR 2,72; IC 95% 1,36 - 5,57; $p=0,003$) e S3P (OR 2,34; IC 95% 1,73 - 3,19; $p < 0,001$). Enquanto que a presença dos alelos S3D (OR 0,66; IC 95% 0,46-0,94; $p=0,019$), S1 (OR 0,50; IC 95% 0,38-0,67; $p < 0,001$) e alelos X (OR 0,90; IC 95% 0,70-1,17; $p=0,456$) estiveram associados a proteção para a doença.

Observamos também que alelos S2 e/ou S3P estiveram presentes em 268 (65%) dos pacientes e 70 (32,5%) indivíduos do grupo controle, mostrando mais uma vez que esses alelos estariam associados com a suscetibilidade à AR (OR 3,86; IC 95% 2,68-5,56; $p < 0,001$).

Tabela 12 - Frequência de alelos HLA-DRB1 de acordo com a classificação de Du Montcel em pacientes e controles

Alelos	AR = 412 (824) n (%)	Controle = 215 (430) n (%)	OR	IC 95%	p
S ₂	55 (6,67)	11 (2,55)	2,72	1,36 - 5,57	0,003
S _{3P}	258 (31,3)	70 (12,27)	2,34	1,73 - 3,19	0,001
S _{3D}	89 (10,8)	67 (15,58)	0,66	0,46 - 0,94	0,019
S ₁	153 (18,56)	134 (31,16)	0,50	0,38 - 0,67	0,001
X	265 (32,16)	148 (34,41)	0,90	0,70 - 1,17	0,456

Os alelos com susceptibilidade para AR: S₂ , S_{3P}. Alelos protetores para AR: S₁, S_{3D} e X.

7.8 Associação de genótipos HLA-DRB1 de acordo com a classificação de Du Montcel na suscetibilidade à artrite reumatóide

A tabela 13 mostra a distribuição de pacientes com AR e indivíduos do grupo controle de acordo com a presença de genótipos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel et al. (8) Observamos que genótipos S₂ S_{3P} (OR 5,72; CI 95% 1,28- 35,64; p= 0,015) e S_{3P} X (OR 2,77; IC 95% 1,65-4,79; p<0,001) tiveram frequência maior dentre o grupo de pacientes e associação estatisticamente significativa com a suscetibilidade à doença, enquanto que genótipos S₁S_{3D} (OR 0,44; IC 95% 0,21-0,92; p= 0,026); S_{3D} X (OR 0,48; IC 95% 0,27-0,85; p=0,010), S₁S₁ (OR 0,41; IC 95% 0,19-0,88; p=0,019) e S₁X (OR 0,44; IC 95% 0,27-0,71; p<0,001) tiveram frequência maior dentre o grupo controle e estiveram associados com a proteção para suscetibilidade à AR.

Tabela 13 - Distribuição de genótipos nos pacientes e controles segundo a classificação de Du Montcel

Genótipo	Distribuição do Genótipo				
	AR = 412 n(%)	Controle =215 n(%)	OR	IC 95%	p
S2 S2	1 (0,2)	0	ND		
S2 S3P	21 (5,1)	2 (0,9)	5,72	1,28 - 35,64	0,015
S2 S1	12 (2,9)	3 (1,4)	2,12	0,55 - 9,56	0,365
S2 S3D	3 (0,7)	2 (0,9)	0,78	0,11 - 6,72	0,839
S2 X	21 (5,1)	4 (1,9)	2,83	0,91 - 9,88	0,079
S3P S3P	27 (6,5)	9 (4,2)	1,61	0,71 - 3,75	0,303
S3P S3D	32 (7,8)	8 (3,7)	2,18	0,94 - 5,23	0,072
S3P S1	51 (12,4)	20 (9,3)	1,38	0,77 - 2,47	0,307
S3P X	99 (24)	22 (10)	2,77	1,65 - 4,70	<0,001
S3D S3D	4 (0,9)	4 (1,9)	0,52	0,11 - 2,48	0,570
S1S3D	17 (4,1)	19 (8,8)	0,44	0,21 - 0,92	0,026
S3D X	30 (7,2)	30 (13,9)	0,48	0,27 - 0,85	0,010
S1 S1	15 (3,6)	18 (8,3)	0,41	0,19 - 0,88	0,019
S1 X	43 (10,4)	45 (20,9)	0,44	0,27 - 0,71	<0,001
X X	36 (8,7)	18 (3,7)	1,05	0,56 - 1,98	0,995

Alelos S2, S3P tem risco maior para AR e alelos S3D,S1, X tem risco baixo e efeito protetor para AR

Para fins de análise, como descrito por Du Montcel et al (8) e Michou et al (9) alelos associados com a proteção para a doença (S1, S3D, X), foram agrupados no denominado alelo L, conformando assim três alelos S2, S3P e L, e seis genótipos S2/S2, S2/S3P, S2/L, S3P/S3P, S3P/L e L/L. A análise de regressão logística dos 6 genótipos decorrentes da agrupação dos alelos protetores, mostra por ordem de hierarquia que genótipos S2/S3P (OR 10,43; IC 95% 2,30-65,58; $p < 0,001$) e S2/L (OR 3,86; IC 95% 1,71-8,98; $p < 0,001$) associaram-se com maior risco para AR, seguidos pelos genótipos S3P/L (OR 3,62; IC 95% 2,41-5,43; $p < 0,001$) e S3P/S3P (OR 2,98; IC 95% 1,28-7,09; $p = 0,008$), quando comparado ao genótipo L/L.

Tabela 14 – Distribuição do genótipo HLA-DRB1 reduzido e risco para AR de acordo a classificação de Du Montcel

Genótipo	Distribuição do genótipo		OR	IC 95 %	P
	AR = 412 n(%)	Controle = 215 n(%)			
S2/ S2	1 (0,2)	0	NP	-	-
S2/S3P	21 (5,1)	2 (0,9)	10,43	2,30 – 65,58	0,001
S2/L	35 (8,5)	9 (4,2)	3,86	1,71 – 8,98	0,001
S3P/L	182 (44,2)	50 (23,3)	3,62	2,41 – 5,43	0,001
S3P/S3P	27 (6,6)	9 (4,2)	2,98	1,28 – 7,09	0,008
L/L	146 (35,4)	145 (67,4)	1(Ref)		

Alelos S2, S3P, L se definem de acordo à seqüência de aminoácidos nas posições 71-74 e conferem susceptibilidade para AR. Os alelos com baixo risco S1, S3D, X) foram agrupados no alelo L, OR razão de Chance.

7.9 Associação entre alelos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel e presença de autoanticorpos

A tabela 15 mostra a relação do estado do FR e os alelos HLA-DRB1 segundo a nova classificação no grupo de pacientes com AR. Observamos que pacientes expressando alelos S2 apresentaram frequência maior de FR + (71%), e pacientes apresentando alelos S3D mostraram frequência menor de FR + (55%). Alelos HLA-DRB1 classificados de acordo proposta de Du Montcel et al (8) não mostraram associação estatisticamente significativa com a presença do FR nos pacientes com AR S2 (OR 1,54; p=0,206), S3P (OR 1,04; p=0,933), S1 (OR 1,04; p=0,928) e S3D (OR 0,69; p=0,165).

Tabela 15 – Relação entre alelos HLA-DRB1 e o fator reumatóide nos pacientes com artrite reumatóide de acordo a classificação de Du Montcel

Alelos HLA-DRB1 e FR	Estado do portador		OR	IC 95%	p
	Sim n(%)	Não n(%)			
Alelo S1					
FR +	87 (63)	170 (62)	1,04	0,67 - 1,63	0,928
FR -	51 (37)	104 (38)			
Alelo S2					
FR +	41 (71)	216 (61)	1,54	0,81 - 2,95	0,206
FR -	17 (29)	138 (39)			
Alelo S3D					
FR +	47 (55)	210 (64)	0,69	0,41 - 1,15	0,165
FR -	38 (45)	117 (36)			
Alelo S3P					
FR +	145 (63)	112 (62)	1,04	0,68 - 1,58	0,933
FR -	86 (37)	69 (38)			

Estado do fator reumatóide (FR) em 412 pacientes com AR e a presença de alelos HLA-DRB1 S1,S2,S3D, S3P.
OR Razão de Chance.

Na tabela 16 mostramos a relação entre o estado de alelos HLA-DRB1 segundo a nova classificação e a presença de ACPA nos pacientes com AR. Observamos maior frequência do ACPA+ em pacientes com alelos S2 (84%) quando comparado pacientes que não possuíam esse alelo seguido dos pacientes com alelos S3P (75%), somente alelos S2 e ACPA mostraram associação estatisticamente significativa (OR 2,42; IC 95% 1,10-5,50; p=0,025). Entretanto, alelos S3D (61%) e S1 (75%) apresentando ACPA estiveram presentes em menor frequência quando comparada, mostrando associação estatisticamente significativa com a proteção somente do alelo S3D (OR 0,55; IC 95% 0,33-0,94; p=0,028).

Tabela 16 - Relação entre alelos HLA-DRB1 e ACPA nos pacientes com artrite reumatóide de acordo a classificação de Du Montcel

Alelos HLA-DRB1 e ACPA	Estado do portador		OR	IC 95%	p
	Sim n(%)	Não n(%)			
Alelo S1					
ACPA +	93 (67)	201 (73)	0,75	0,47 - 1,20	0,250
ACPA -	45 (33)	73 (27)			
Alelo S2					
ACPA +	49 (84)	245 (69)	2,42	1,10 - 5,50	0,025
ACPA -	9 (16)	109 (31)			
Alelo S3D					
ACPA +	52 (61)	242 (74)	0,55	0,33 - 0,94	0,028
ACPA -	33 (39)	85 (26)			
Alelo S3P					
ACPA +	174 (75)	120 (66)	1,55	0,99 - 2,44	0,057
ACPA -	57 (25)	61 (34)			

ACPA - = Anticorpos contra proteínas citrulinadas negativos, ACPA + = Anticorpos contra proteínas citrulinadas positivos, Alelos HLA-DRB1 S1,S2,S3D, S3P. OR Razão de Chance.

A tabela 17 mostra resultados da relação entre alelos de maior risco para AR (S2 e ou S3P) classificados por Du Montcel et al, (8) e os autoanticorpos FR e ACPA. Duzentos e sessenta e oito (65%) pacientes com AR expressavam alelos S2 e/ou S3P, e desses 174 (64,9%) pacientes apresentavam FR positivo e 206 (76,8 %) ACPA positivo. Associação estatisticamente significativa foi observada somente para alelos S2 e/ou S3P com ACPA (OR 2,11; IC95% 1,33-3,36; p=0,001).

Níveis séricos elevados de ACPA (média 105,6 UI/ml, mediana 126,5 UI/mL \pm DP 71,3) para pacientes com AR expressando alelos S2 e /ou S3P foram observados neste estudo quando, quando comparado a pacientes com alelos S2 e /ou S3P negativos (média 85,4 UI/mL, mediana 81,4 UI/mL \pm 74,4).

A tabela 18 mostra a relação de níveis séricos de autoanticorpos e alelos S1, S2, S3D, S3P. Observamos que níveis séricos elevados de FR e ACPA positivos estão presentes independentes do grupo alélico de alto (S2, S3P) ou baixo risco (S1, S3D) para AR..

Tabela 17 - Associação de alelos HLA-DRB1 de maior gravidade de acordo com a classificação de Du Montcel e autoanticorpos em pacientes com artrite reumatóide

Autoanticorpos	Alelos S2 e ou S3P		OR	IC 95%	p
	Sim n(%)	Não n(%)			
FR					
Positivo	174 (64,9)	83 (57,6)	1,36	0,88 – 2,10	0,177
Negativo	94 (35,1)	61 (42,4)			
ACPA					
Positivo	206 (76,8)	88 (21,3)	2,11	1,33 – 3,36	0,001
Negativo	62 (23,2)	56 (13,6)			
Total	268	144			

Alelos S2 e ou S3P com maior risco para A, FR= fator reumatóide, ACPA= anticorpos anti-peptídeos citrulinados, OR Razão de Chance

Tabela 18 – Distribuição de níveis séricos de FR e ACPA positivos e alelos HLA-DRB1 de acordo com a classificação de Du Montcel em pacientes com artrite reumatóide

Alelos HLA-DRB1 e autoanticorpos +	n°(%)	Nível sérico de autoanticorpos FR e ACPA positivos				
		Média UI/mL	Mediana UI/mL	Mínimo UI/mL	Máximo UI/mL	DP
Alelos S1						
FR+	87 (63)	263	109	21	2280	443
ACPA+	93 (67)	135	158	21	237	54
Alelos S2						
FR+	41 (71)	216	103	21	1956	340
ACPA+	49 (84)	124	143	23	148	55
Alelos S3D						
FR+	47 (55)	455	142	23	9360	1357
ACPA+	52 (61)	137	158	25	199	52,3
Alelos S3P						
FR+	145 (63)	318	130	21	9360	827
ACPA+	174 (75)	140	159	25	234	50

ACPA+ = Anticorpos contra proteínas citrulinadas positivos, FR+= Fator Reumatóide, Alelos HLA-DRB1 S1,S2,S3D, S3P. OR Razão de Chance.

7.10 Relação do escore de Sharp modificado de Van Der Heijde e alelos HLA-DRB1 EC de acordo a nova classificação proposta por Du Montcel

A tabela 19 mostra a distribuição dos pacientes com AR de acordo com o tempo de doença, a média, mediana e desvio padrão avaliado pelo método do escore de Sharp modificado de Van Der Heijde e a relação de alelos HLA-DRB1 classificados de acordo a nova classificação proposta por Du Montcel et al.(8) Observamos que quando maior o tempo de evolução da doença dos pacientes com AR, maior a presença de lesão articular e óssea independente da presença de alelos S1, S2, S3D, S3P e X, embora devamos ressaltar que nos pacientes AR com menos de 2 anos de diagnóstico, a pontuação da mediana e DP do escore de lesão articular e óssea tenha sido maior nos pacientes expressando alelos S3P + (14 ± 78) enquanto pontuação menor foi observada nos portadores de alelos S1+ (8 ± 106) quando comparado com os pacientes com outros alelos. Similar pontuação do escore de lesão radiográfica dentre os pacientes portadores de alelos S2 e X (58 ± 188) observamos no grupo de pacientes com 2 a 5 anos de doença, sendo significativamente menor nos portadores do alelo S3D (10 ± 56). Enquanto que, pacientes com AR entre 5 a 10 anos de doença, expressando alelos S2 (80 ± 72) e S3D (88 ± 67) apresentaram maior lesão articular e óssea e alelo X (75 ± 66) menor escore de Sharp. Pacientes com AR com mais de 10 anos de diagnóstico mostraram maior escore de Sharp nos portadores de alelos S3P (163 ± 78), enquanto que pacientes com alelos S1 (134 ± 86) mostraram menor lesão articular e óssea quando comparado a pacientes com outros alelos. A avaliação de lesão articular e óssea no exame radiográfico não mostraram ser diferente quando analisado independente do tempo de doença em pacientes apresentando alelos de maior risco (S2,S3P) e menor risco para AR (S1,S3D,S3P,X ($p>0,05$) Tabela 20.

Tabela 19 - Distribuição dos pacientes com artrite reumatóide de acordo ao tempo de doença, HLA-DRB1 segundo a classificação de Du Montcel e escore de Sharp modificado de Van Der Heijde

Tempo de doença	AR=412 nº(%)	Alelos +(n)	Rx lidas n(%)	Escore de Sharp modificado de Van Der Heijde				
				Média	Mediana	Min	Máx	DP
< de 2 anos	50 (12)	S1 (16)	46 (92)	16	8	0	106	26
		S2 (7)		15	11	3	30	10
		S3D (6)		22	10	2	56	23
		S3P (25)		23	14	0	162	78
		X (26)		24	13	7	162	37
2 a 5 anos	54 (13)	S1 (19)	51(94)	50	37	8	137	40
		S2 (9)		71	58	12	188	49
		S3D (15)		61	10	2	56	56
		S3P (33)		61	56	0	179	45
		X (21)		69	58	13	188	50
5 a 10 anos	190 (46)	S1 (63)	180 (95)	97	78	0	317	65
		S2 (23)		97	80	0	288	72
		S3D (29)		104	88	0	290	67
		S3P (94)		90	77	0	379	62
		X (107)		89	75	0	379	66
>de 10 anos	118 (29)	S1 (27)	104 (88)	144	134	13	351	86
		S2 (14)		158	135	52	254	70
		S3D (27)		130	145	9	232	68
		S3P (61)		154	163	0	351	78
		X (60)		153	139	17	328	73

Rx = Radiografia, AR= Artrite reumatóide, DP= Desvio Padrão, Min= Mínimo, Máx= Máximo

Tabela 20 - Distribuição dos pacientes com artrite reumatóide de acordo ao tempo de doença, escore de Sharp modificado de Van Der Heijde e alelos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel

Escore de Sharp modificado de Van Der Heijde							
HLA-DRB1	AR n(%)	Média	Mediana	Min	Máx	DP	p
S1+	126 (33)	89	80	0	351	75	0,259
S1-	255 (67)	97	68	0	379	75	
S2+	53 (14)	98	82	0	254	76	0,752
S2-	328 (86)	94	75	0	379	75	
S3D+	77 (20)	97	86	0	290	71	0,518
S3D-	304 (80)	94	76	0	379	76	
S3P+	213 (56)	95	77	0	379	75	0,767
S3P-	168 (44)	94	78	0	328	75	
X+	214 (56)	97	78	0	379	75	0,362
X-	167 (44)	91	74	0	351	74	

Foram avaliados alelos S1, S2, S3D, S3P e X positivos e negativos e avaliados pelo teste não paramétrico de Mann Whitney/Wilcoxon. DP= Desvio Padrão, Min= Mínimo, Máx= Máximo

Embora pacientes expressando genótipos S3P/S3D e S2S3D tenham apresentado maior pontuação da mediana \pm DP (120 ± 75 e 115 ± 76 respectivamente) e maior lesão articular e óssea quando comparado a outros genótipos, eles não mostraram diferença estatisticamente ($p > 0,05$) Tabela 21. Estes resultados evidenciaram que pacientes com AR apresentam lesão articular e óssea independente da presença de alelos e genótipos HLA-DRB1 classificados de acordo a proposta de Du Montel et al. (30)

Tabela 21 - Distribuição dos pacientes com artrite reumatóide de acordo com o tempo de doença, escore de Sharp modificado de Van Der Heijde e genótipos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel

Genótipo		Escore de Sharp modificado de Van Der Heijde					
HLA-DRB1	AR n	Média	Mediana	Min	Máx	DP	p
S1S1	11	93	84	14	279	71	0,914
S1S3D	15	93	96	10	222	61	0,727
S2S1	12	110	79	3	254	87	0,575
S2S2	1	-	-	-	-	-	-
S2S3D	3	87	115	0	135	76	0,924
S2S3P	17	95	84	11	240	77	0,963
S2X	20	98	85	0	237	72	0,697
S3DS3D	4	58	69	22	75	24	0,442
S3DX	27	94	86	2	290	77	0,934
S3PS1	47	83	66	0	351	77	0,142
S3PS3D	28	110	120	8	228	75	0,251
S3PS3P	27	88	65	0	290	74	0,601
S3PX	94	98	78	0	379	73	0,292
S1S1	34	99	76	5	328	86	0,996

Foram avaliados genótipos de acordo a classificação de Du Montcel et al, pelo teste não paramétrico de Mann Whitney/Wilcoxon, DP= Desvio Padrão, Min= Mínimo, Máx= Máximo

8 DISCUSSÃO

Estudos genéticos realizados inicialmente em gêmeos e posteriormente em familiares demonstraram uma predisposição familiar para AR, representando 60% do risco total para o desenvolvimento da doença na população. (4) Diversos estudos demonstraram que o fator genético mais importante associado à susceptibilidade da AR é a presença do HLA-DRB1 do MHC descoberto por Stastny et al, (6) e posteriormente, organizado na hipótese do EC por Gregersen et al. (7)

Técnicas modernas como as empregadas em estudos de genoma completo (GWAS) e marcadores genéticos de polimorfismo de único nucleotídeo (SNP), confirmam a associação significativa desses alelos com a AR. No entanto, é importante ressaltar que a associação da AR com o HLA-DRB1 e a hipótese do EC não explica toda a susceptibilidade genética conferida pelo HLA. Outros genes do HLA, sem EC, tais como, os alelos HLA-DRB1*03:01, DRB1*07:01 e DRB1*09:01, embora com uma frequência menor, também foram associados a uma maior susceptibilidade para a AR.(75, 76) O que codifica para a proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN 22) presente em 8% dos pacientes com AR.(23) Em menor proporção foram descritas associações com o sinal transdutor e ativador de transcrição 4 (STAT 4), o antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), o fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), e peptidilarginina deaminase 4 (PADI 4).(36) Neste estudo 90,8% dos pacientes eram mulheres, semelhante aos resultado encontrados no estudo realizado por Bértolo et al (14) em 2001 (84,6%) e por Louzada-Junior et al (34) em 2008 (77,8%).

Quanto à composição étnica, existe predomínio de mestiços neste estudo, seguido de brancos e negros, configurando-se como uma amostra altamente miscigenada (descendentes principalmente de portugueses, africanos, indígenas, italianos, espanhóis e alemães) que acreditamos refletir, em parte, a da própria população brasileira. A influência da etnia é ponto fundamental quando se avalia a associação dos genes HLA com doenças, especialmente com artrite reumatóide. Além de ser um sistema altamente polimórfico, distintos alelos são associados com a AR, em diferentes populações. Desta forma, ao estudar uma população altamente miscigenada como a brasileira, tais associações poderiam se perder. No intuito de controlar esta variável, todo estudo de associação HLA e doença necessita de que os indivíduos controle sejam oriundos da mesma região geográfica dos pacientes, a fim de preservar as influências sociais e demográficas em ambos os grupos. O nosso estudo além de

avaliar uma amostra significativa de pacientes com AR (n=412), também tipificou indivíduos saudáveis (n=215) todos provenientes da mesma região geográfica dos pacientes.

Em princípio, a idade em estudos genéticos não teria influência na susceptibilidade, porém, em virtude da presença de alelos HLA-DRB1 com EC+ entre 12,5% a 35% (34, 77) da população sadia e a incidência maior da AR entre 30 a 55 anos, (2) tentamos evitar viés de análise quanto ao diagnóstico no grupo controle, por isso decidimos incluir no nosso grupo controle indivíduos com idade mais avançada.

No presente estudo encontramos frequência aumentada de HLA-DRB1*04:01, *04:04 e *04:05 e associação positiva com a susceptibilidade da AR. Este resultado está, em parte, de acordo com os observados por Louzada-Junior et al (34) na população brasileira predominantemente caucasóide, no qual, além da associação com os alelos citados anteriormente, também encontraram associação com o alelo HLA-DRB1*01:01 ($p < 0,05$). Por outro lado, difere da observada por Bértolo et al (14) que observaram associação significativa só com alelos HLA-DRB1*01 (RR=2,8; $p < 0,05$) também analisando populações de origem caucasiana.

Assim como observado por Louzada-Júnior et al, o alelo HLA-DRB1*14:02 mostrou tendência de associação com a AR, embora de forma não significativa (OR3,18; IC 95% 0,88–13,63; $p=0,086$) (34). É possível que estudos com um número maior de indivíduos possam mostrar que essa associação ocorra efetivamente. Num estudo com população mestiça peruana (n=65), essa associação entre o alelo HLA-DRB1*14:02 e a AR foi observada (RR=2,74; $p=0,02$) (31).

A presença dos alelos HLA-DRB1*09 em 6,7% dos pacientes com AR e 1,3% dos controles, predominante em descendentes de negros e indígenas, mostrou associação significativa nos genótipos heterozigotos destes alelos (OR 5,19; IC 95% 1,50-21,49; $p=0,004$), não obstante, o amplo intervalo de confiança observado, este alelo pela primeira vez foi associada a AR na população brasileira. Essa mesma associação (HLA-DRB1*09 e AR) também foi observada em pacientes chilenos com AR em 1990. (78) Por outro lado, estudo realizado no Japão com 852 pacientes com AR, encontrou associação apenas do genótipo HLA-DRB1*09:01 homozigotos com a doença. (75)

Semelhante aos estudos de Vignal et al (OR 5,04; $p < 0,001$) e Balsa et al (OR1,8; $p=0,005$) incluindo população homogênea, (36, 79) também encontramos associação de HLA-DRB1 EC+ com a AR (OR3,59; $p < 0,001$). Resultado distinto ao descrito no estudo realizado por Teller et al (80) incluindo pacientes com AR e controles hispano-americanos, na qual não

foi observada associação destes alelos com a doença, estudo que sugere que a hipótese do EC provavelmente, não poderia ser aplicada em estudos de população não miscigenada.

No presente estudo, pode se observar frequência aumentada de genótipos HLA-DRB1 EC heterozigotos (51%) quando comparado aos pacientes com AR e controle com genótipos homozigotos (11%). Em estudo realizado por Del Rincon et al (81) foi observado em 52% dos pacientes com AR genótipos EC heterozigotos e em 22% alelos EC homozigotos. Entretanto, Balsa et al (36) encontraram que 29,8% dos pacientes eram heterozigotos e 14% eram homozigotos Neste estudo, após análise de regressão logística dos genótipos HLA-DRB1 com EC homozigotos e heterozigotos, observamos que pacientes que apresentam EC, independente de serem homozigotos (OR 3,86) ou heterozigotos (OR 3,5), apresentam risco aumentado, mas de magnitude semelhante para o desenvolvimento da AR. Este nosso resultado se contrapõe com o de del Rincón et al (81) na qual a análise de 141 pacientes mexicanos com AR e 54 controles concluiu que existe maior risco para genótipos EC homozigotos (OR 21,53) quando comparados com genótipos heterozigotos para EC (OR 1,84).

Em relação a alelos HLA-DRB1 protetores para AR, observamos que alelos HLA-DRB1 codificadores da sequência de aminoácidos DERAA estão associados a um risco menor de desenvolver AR (OR 0,42), semelhante ao observado por Louzada-Junior et al (34) em 2008 (OR 0,049). No estudo realizado por Carrier et al (43) em pacientes com poliartrite de início recente acompanhados durante 30 meses, observaram que alelos DERAA não foram associados à produção de autoanticorpos nos pacientes com AR assim como também mostraram efeito protetor para a doença (OR 0,30; $p=0,001$). Mais recentemente, Balsa et al (36) relataram que estes alelos conferem proteção para AR apenas com ACPA circulante (OR 0,58;). Outro estudo mostrou que alelos DERAA além de conferir efeito protetor para AR, estariam associados à enfermidade menos grave.(42)

Alelos HLA-DRB1 com EC foram relacionados com a positividade do FR e ACPA, embora, somente a presença do ACPA tenha se mostrado significativa (OR 1,26; $p=0,313$ e OR 2,03; $p=0,001$, respectivamente). Irigoyem et al em 2005, (82) observaram forte associação do ACPA com alelos EC, independentemente da presença FR (OR 5,8; IC 95% 4,1-8,3; $p<0,001$ e OR 3,1; IC 95% 1,8-5,3; $p<0,001$). Semelhante ao observado por Balsa et al, este estudo mostra que genótipos HLA-DRB1 EC homozigotos apresentam titulação média do ACPA mais alta quando comparada aos genótipos heterozigotos e aos dos pacientes sem o EC (36) Neste estudo, observamos que 88,8% de 27 pacientes com alelo HLA-DRB1*09,

apresentaram ACPA e 85% FR, sugerindo que outros mecanismos não EC estariam implicados no risco genético para AR em pacientes com ou sem FR e ACPA.

Neste estudo, observamos que a presença de lesão articular e óssea avaliados pelo método de Sharp modificado de Van Der Heijde dos pacientes com AR tiveram aumento progressivo de acordo com o tempo de evolução, independentemente da presença dos alelos HLA-DRB1 EC. Diferente do observado por estudos prospectivos como o realizado por del Ricón et al (81) que mostraram que pacientes com AR expressando genótipos HLA-DRB1 EC homozigotos como heterozigotos tiveram maior lesão articular do que os pacientes sem o EC ($p=0,002$). Mais tarde Massardo et al (83) mostraram também que pacientes com AR apresentando um ou dois alelos HLA-DRB1 EC tiveram doença mais erosiva quando comparado a pacientes sem esses alelos (RR 4,24; $p=0,0002$). Além disso, Goronzy et al em 2004 (38) mostraram que alelos HLA-DRB1*04, em particular genótipos homozigotos destes alelos foram preditores univariados para progressão radiográfica após 5 anos de seguimento. Divergência que poderia ser explicado pelo tipo de metodologia empregada neste estudo.

Tezenas Du Montcel et al em 2005(8), propuseram uma nova classificação de alelos HLA-DRB1 reconsiderando a hipótese do EC na susceptibilidade da AR, de acordo com esta nova classificação, o risco para desenvolver AR dependeria estritamente da sequência dos aminoácidos RAA nas posições 70 a 72 modulada pelos aminoácidos na posição 71 e 70, que levou a definição de 5 grupos de alelos HLA-DRB1 S1, S2, S3D, S3P, X. Michou et al validaram esta nova classificação e observaram assim como Du Montcel et al(8) que alelos S2 ($p<0,001$), S3P ($p=0,001$) estariam associados com maior risco para AR e alelos S1 ($p=0,007$), S3D ($p=0,02$) e X ($p=0,003$) associados a menor risco para a doença. Mais recentemente Gyetvai et al (11), também observaram que alelos S2 (OR 4,06; $p=0,002$), S3P (OR 2,42; $p=0,01$) estavam associados à susceptibilidade à AR e alelos S1 (OR 0,45; $p=0,03$), S3D (OR 0,66; $p=0,45$) e X (OR 0,69; $p=0,39$) associados à proteção para a doença. Resultados que foram confirmados neste estudo ($p<0,05$).

A análise dos genótipos HLA- DRB1 classificadas por Du Montcel et al (8) mostrou que genótipos S2/S3P (OR 5,72; $p=0,015$) e S3P/X (OR 2,77, $p<0,001$) associaram-se significativamente a maior risco para AR no nosso estudo. Diferente do observado por Du Montcel et al, (8) que além da associação do genótipo S2/S3P (RR 7,58) com a susceptibilidade da doença, em outros genótipos contendo alelos predisponentes à susceptibilidade para a doença S2/S2 (RR 6,63) e S3P/S3P (RR 3,76), e também mostraram risco maior para a doença, seguido dos genótipos contendo alelos de maior e menor risco para AR S2/S3D (RR 3,39), S2/X (RR 3,20).

Após agrupar os alelos associados com risco baixo para AR no denominado alelo L, assim como realizado por Du Montcel et al (8) e Michou et al, (9) nossos resultados mostraram que genótipos S2/S3P foram associados a maior risco para AR (OR 10,43; $p < 0,001$) semelhante ao observado pelos últimos autores citados acima (OR 6,62 $p < 0,001$ e OR 19,5 IC 95% 6,6-57,2) e por Barnetche et al (44) no estudo incluindo população caucasóide e não caucasóide (OR 7,25, $p < 0,001$). Nossos resultados também mostraram que o genótipo S2/S2 esteve expresso somente em um paciente (OR 0), diferente dos resultados obtidos nos estudos acima citados, que mostraram risco maior para AR (OR 5,91; $p < 0,001$; OR 18; IC 95% 4,5-7,1 e OR 4,95; $p < 0,001$ respectivamente), outra diferença observada foi o risco maior conferido pelos genótipos S2/L (OR 3,86; $p < 0,001$ e S3P/L OR 3,62; $p < 0,001$) no nosso estudo do que o genótipo S3P/S3P que mostrou por ordem de hierarquia ter maior risco nos outros estudos.

Em relação à associação dos autoanticorpos (FR e ACPA) com alelos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel et al.(8) Este estudo, não observamos associação estatisticamente significativa entre o FR e alelos HLA-DRB1. Aspecto diferente do observado por Gourraud et al em 2007, (10) onde alelos S2 estiveram associados à produção do FR (OR 3,21; $p = 0,002$), e pacientes expressando alelos S1 (OR 0,39; $p = 0,011$) e S3D (0,37; $p = 0,014$) apresentaram associação com à proteção para a produção de FR. Entretanto, nossos resultados mostraram que alelos S2 mostraram associação estatisticamente significativa com a produção de ACPA (OR 2,42; $p = 0,02$) e alelo S3D foi associado a proteção para a produção de ACPA (OR 0,55; $p = 0,028$). Resultado distinto ao descrito no estudo realizado por Gourraud et al, (10) no qual além do alelo S2 (OR 3, 21; $p = 0,002$) o alelo S3P (OR 2,65; $p = 0,006$) também estiveram fortemente associados com a produção de ACPA enquanto que alelos S3D (OR 0,27; $p = 0,001$) e S1 (OR 0,44; $p = 0,031$) associaram-se com produção do ACPA. Outro estudo realizado por Gyetvai et al (11) mostrou que não só alelos S2 e S3P, mas em menor medida, alelos S1 e S3D também foram associados com a produção de ACPA ($p < 0,0001$; OR 2,46; $p = 0,004$; OR 1,98; $p = 0,01$ e OR 1,24; $p = 0,027$ respectivamente).

Ainda sobre a associação de autoanticorpos e alelos HLA-DRB1 segundo a nova classificação, observamos que pacientes expressando alelos de risco maior (S2 e/ou S3P) estiveram associados somente com a presença de ACPA (OR 2,11; $p = 0,001$), semelhante a observada recentemente por Gyetvai et al (OR 4,78; $p < 0,001$) (11).

Os resultados da avaliação das radiografias pelo método do escore de Sharp modificado de Van Der Heijde dos pacientes com AR, mostraram aumento progressivo da lesão articular e óssea com o aumento do tempo de doença, independente da expressão de

alelos ou genótipos HLA-DRB1 classificados por Du Montcel et al ($p > 0,05$) (8). Distinto do observado no estudo realizado por Gourraud et al em 2006 (12), no qual pacientes com AR de início recente, após 4 anos de seguimento mostrou que alelos S2 estavam associados a maior progressão radiológica ($p = 0,004$), enquanto que, pacientes com alelos S3D apresentaram menor progressão radiográfica ($p < 0,001$) e genótipos com alelo S3D foram associadas com a proteção para lesão articular e genótipos com alelo S2 predisponentes para maior progressão da gravidade estrutural nos pacientes com AR.

9 CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo, com amostra populacional predominantemente mestiça representativa do povo brasileiro, evidenciou que os alelos HLA-DRB1*04:01, *04:04, e *04:05 se associaram com susceptibilidade aumentada para AR, destacando-se também a associação com o alelo DRB1*09. Os nossos resultados corroboram a associação entre alelos DRB1 EC e a susceptibilidade à AR e ACPA previamente documentada em estudos com amostras populacionais geneticamente homogêneas. Além disso, mostramos que a presença do EC, quer em dose única ou dupla, comportou-se como fator de risco independente para a doença, bem como a presença de alelos DERA A apresentaram efeito protetor. Ademais, os alelos HLA-EC estiveram associados a maior positividade e maiores níveis séricos de ACPA.

Também através deste estudo, determinamos a importância da reavaliação da hipótese do EC e a proposta de uma nova classificação que nos permita estimar o risco dos alelos e genótipos em relação à susceptibilidade à AR. Nossos resultados corroboram a associação entre alelos S2 e S3P com a susceptibilidade aumentada para AR e a associação de alelos S1, S3D e X com o efeito protetor para a doença, assim como a associação dos alelos de maior risco com a produção de ACPA.

Embora as diretrizes para o diagnóstico da AR, estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Reumatologia em 2011(84) recomendem que a pesquisa do HLA-EC não deva ser ainda um exame de rotina diária ao atendimento de pacientes com suspeita de AR pelo seu custo elevado, o nosso estudo corrobora a sua importância para o estabelecimento de fatores de risco e de proteção ao desenvolvimento da AR.

REFERÊNCIAS

1. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004 Mar;31(3):594-7.
2. Pinheiro GRC. Artrite Reumatoide. In: Moreira C, Pinheiro GRC, Marques NJF, editor. *Reumatologia Essencial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p. 338-54.
3. MacGregor AJ SA. classification and epidemiology. In: Hochberg MC SA, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editor. *Rheumatology*. 4a ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008. p. 755-61.
4. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):30-7.
5. Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, Brown MA. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 2004 May;5(3):151-7.
6. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 1978 Apr 20;298(16):869-71.
7. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987 Nov;30(11):1205-13.
8. du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, et al. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1063-8.
9. Michou L, Croiseau P, Petit-Teixeira E, du Montcel ST, Lemaire I, Pierlot C, et al. Validation of the reshaped shared epitope HLA-DRB1 classification in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3):R79.
10. Gourraud PA, Dieude P, Boyer JF, Nogueira L, Cambon-Thomsen A, Mazieres B, et al. A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for autoantibody production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(2):R27.
11. Gyetvai A, Szekanecz Z, Soos L, Szabo Z, Fekete A, Kapitany A, et al. New classification of the shared epitope in rheumatoid arthritis: impact on the production of various anti-citrullinated protein antibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Jan;49(1):25-33.
12. Gourraud PA, Boyer JF, Barnetche T, Abbal M, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A, et al. A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for rheumatoid arthritis structural severity. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb;54(2):593-9.

13. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):903-11.
14. Bértolo M.B CLTL, Persoli L.B, Costa F. F. Alelos HLA-DRB1 e prognóstico da artrite reumatóide em pacientes brasileiros. *Rev Bras Reumatol*. 2001 mai/jun.;41(3):151-6.
15. Combe B, Eliaou JF. [Can the prognosis of early rheumatoid arthritis be predicted?]. *Presse Med*. 1995 May 20;24(18):839-41.
16. Hochberg MC SA, Smolen JS, Weinblatt ME & Weisman MH. *Rheumatology*. 4 Mosby ed; 2008.
17. Tamayo RP. *Artritis Reumatoide, Bases Moleculares, clínicas y Terapéuticas. Epidemiología clínica*. 1 ed. Colombia; 2006.
18. Barton A, Ollier W. Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 May;14(3):260-9.
19. Bali D, Gourley S, Kostyu DD, Goel N, Bruce I, Bell A, et al. Genetic analysis of multiplex rheumatoid arthritis families. *Genes Immun*. 1999 Sep;1(1):28-36.
20. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Apr;47(4):399-402.
21. Lee HS LA, Criswell LA, Seldin MF, Amos CI, Carulli JP, et al. Several Regions in the Major Histocompatibility Complex Confer Risk for Anti-CCP-Antibody Positive Rheumatoid Arthritis, Independent of the DRB1 Locus. *Mol Med*. 2008;14((5-6)):293-300.
22. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG, Nath SK, et al. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Jan;46(1):49-56.
23. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2009 Feb 21;373(9664):659-72.
24. Sobrino Porto MLC PFS, Souza E. *Estudos de Associação HLA x Doenças: Extratos do I Simpósio Brasileiro*. Rio de Janeiro: EdUERJ 2007.
25. Donadi E. Aspectos Moleculares do Complexo Principal de Histocompatibilidade: Como Entender a Associação entre o Sistema HLA e as Doenças Reumáticas *Rev Bras Reumatol*. 2001 Jul/Ago.;41(4):225-36.
26. Morgan AW, Haroon-Rashid L, Martin SG, Gooi HC, Worthington J, Thomson W, et al. The shared epitope hypothesis in rheumatoid arthritis: evaluation of alternative classification criteria in a large UK Caucasian cohort. *Arthritis Rheum*. 2008 May;58(5):1275-83.

27. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer AH. Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2002 Jun;31(6):355-60.
28. Lee HS, Lee KW, Song GG, Kim HA, Kim SY, Bae SC. Increased susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. *Arthritis Rheum.* 2004 Nov;50(11):3468-75.
29. Wakitani S, Murata N, Toda Y, Ogawa R, Kaneshige T, Nishimura Y, et al. The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese. *Br J Rheumatol.* 1997 Jun;36(6):630-6.
30. de Vries N, Ronningen KS, Tilanus MG, Bouwens-Rombouts A, Segal R, Egeland T, et al. HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews: sequencing reveals that DRB1*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype. *Tissue Antigens.* 1993 Jan;41(1):26-30.
31. Castro F, Acevedo E, Ciusani E, Angulo JA, Wollheim FA, Sandberg-Wollheim M. Tumour necrosis factor microsatellites and HLA-DRB1*, HLA-DQA1*, and HLA-DQB1* alleles in Peruvian patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2001 Aug;60(8):791-5.
32. Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD, Arcos-Burgos M. Rheumatoid arthritis association in Colombian population is restricted to HLA-DRB1*04 QRRAA alleles. *Genes Immun.* 2002 Feb;3(1):56-8.
33. Citera G, Padulo LA, Fernandez G, Lazaro MA, Rosemffet MG, Maldonado Cocco JA. Influence of HLA-DR alleles on rheumatoid arthritis: susceptibility and severity in Argentine patients. *J Rheumatol.* 2001 Jul;28(7):1486-91.
34. Louzada Junior P FM, Oliveira DR, Deghaide HS, Conde RA, Bértolo MB, et al. . A majority of Brazilian patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1 alleles carry both the HLA-DRB1 shared epitope and anti-citrullinated peptide antibodies *Braz J Med Biol Res Online Ahead of Print.* 2008.
35. O'Dell JR, Nepom BS, Haire C, Gersuk VH, Gaur L, Moore GF, et al. HLA-DRB1 typing in rheumatoid arthritis: predicting response to specific treatments. *Ann Rheum Dis.* 1998 Apr;57(4):209-13.
36. Balsa A, Cabezon A, Orozco G, Cobo T, Miranda-Carus E, Lopez-Nevot MA, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R62.
37. Meyer JM, Evans TI, Small RE, Redford TW, Han J, Singh R, et al. HLA-DRB1 genotype influences risk for and severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1999 May;26(5):1024-34.

38. Goronzy JJ, Matteson EL, Fulbright JW, Warrington KJ, Chang-Miller A, Hunder GG, et al. Prognostic markers of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan;50(1):43-54.
39. Mattey DL, Thomson W, Ollier WE, Batley M, Davies PG, Gough AK, et al. Association of DRB1 shared epitope genotypes with early mortality in rheumatoid arthritis: results of eighteen years of followup from the early rheumatoid arthritis study. *Arthritis Rheum.* 2007 May;56(5):1408-16.
40. Reveille JD. Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future. *J Rheumatol Suppl.* 2005 Jan;72:10-3.
41. Vos K, van der Horst-Bruinsma IE, Hazes JM, Breedveld FC, le Cessie S, Schreuder GM, et al. Evidence for a protective role of the human leukocyte antigen class II region in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2001 Feb;40(2):133-9.
42. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, de Vries RR, Toes RE. An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis Rheum.* 2005 Sep;52(9):2637-44.
43. Carrier N, Cossette P, Daniel C, de Brum-Fernandes A, Liang P, Menard HA, et al. The DERA HLA-DR alleles in patients with early polyarthritis: protection against severe disease and lack of association with rheumatoid arthritis autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2009 Mar;60(3):698-707.
44. Barnetche T, Constantin A, Cantagrel A, Cambon-Thomsen A, Gourraud PA. New classification of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis susceptibility: a combined analysis of worldwide samples. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):R26.
45. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007 Sep 20;357(12):1199-209.
46. Raychaudhuri S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* Mar;22(2):109-18.
47. Karlson EW, Chibnik LB, Kraft P, Cui J, Keenan BT, Ding B, et al. Cumulative association of 22 genetic variants with seropositive rheumatoid arthritis risk. *Ann Rheum Dis.* Jun;69(6):1077-85.
48. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Oct;50(10):3085-92.
49. Lee HS, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, et al. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum.* 2007 Jun;56(6):1745-53.

50. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, le Cessie S, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2007 Feb;56(2):425-32.
51. Carvalho MA PM, Bértolo MB. *Artrite Reumatoide*. 3 ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2008.
52. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):315-24.
53. Neto NSR CJ. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. *Rev Bras Reumatol.* 2009 Jul/Ago 2009;;49(4):413-30.
54. Lee DM, Schur PH. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2003 Sep;62(9):870-4.
55. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res.* 2000;2(3):236-43.
56. Saraux A, Berthelot JM, Chales G, Le Henaff C, Mary JY, Thorel JB, et al. Value of laboratory tests in early prediction of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Apr 15;47(2):155-65.
57. van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 2002;4(2):87-93.
58. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000 Jan;43(1):155-63.
59. van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(4):249-51.
60. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004 Feb;50(2):380-6.
61. van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004 Mar;50(3):709-15.
62. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 Aug;43(8):1831-5.

63. Mewar D, Coote A, Moore DJ, Marinou I, Keyworth J, Dickson MC, et al. Independent associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor with radiographic severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R128.
64. Im CH KE, Ryu HJ, Lee JH, Lee EY, Lee YL, et al. . Anti-cyclic citrullinated peptide antibody is associated with radiographic erosion in rheumatoid arthritis independently of shared epitope status. *Rheumatol Int*. 2009;29:251-6.
65. Hill JA SS, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*. 2003;171:538-41.
66. Kaltenhauser S, Pierer M, Arnold S, Kamprad M, Baerwald C, Hantzschel H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide are associated with the DRB1 shared epitope and predict joint erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Jan;46(1):100-4.
67. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):38-46.
68. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis*. 2008 Oct;67(10):1488-92.
69. Klareskog L, Ronnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:651-75.
70. van der Heijde DM. Radiographic imaging: the 'gold standard' for assessment of disease progression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000 Jun;39 Suppl 1:9-16.
71. Kihara A KM, Silva J, Sakamoto FA, Ciconelli RM, NATAOR J, et al. Diagnóstico por Imagem do Antepé de Pacientes com Artrite Reumatoide Inicial. *Rev Bras Reumatol*. 2007 mar/abr;47(2):123-6.
72. van der Heijde D, Dankert T, Nieman F, Rau R, Boers M. Reliability and sensitivity to change of a simplification of the Sharp/van der Heijde radiological assessment in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999 Oct;38(10):941-7.
73. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Jun 15;59(6):762-84.
74. Telles E. *Racismo à Brasileira: uma Nova Perspectiva Sociológica* 1ed. Rio de Janeiro; 2003.

75. Wakitani S, Imoto K, Murata N, Toda Y, Ogawa R, Ochi T. The homozygote of HLA-DRB1*0901, not its heterozygote, is associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *Scand J Rheumatol.* 1998;27(5):381-2.
76. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):205.
77. MacGregor A, Ollier W, Thomson W, Jawaheer D, Silman A. HLA-DRB1*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol.* 1995 Jun;22(6):1032-6.
78. Gonzalez A, Nicovani S, Massardo L, Aguirre V, Cervilla V, Lanchbury JS, et al. Influence of the HLA-DR beta shared epitope on susceptibility to and clinical expression of rheumatoid arthritis in Chilean patients. *Ann Rheum Dis.* 1997 Mar;56(3):191-3.
79. Vignal C, Bansal AT, Balding DJ, Binks MH, Dickson MC, Montgomery DS, et al. Genetic association of the major histocompatibility complex with rheumatoid arthritis implicates two non-DRB1 loci. *Arthritis Rheum.* 2009 Jan;60(1):53-62.
80. Teller K, Budhai L, Zhang M, Haramati N, Keiser HD, Davidson A. HLA-DRB1 and DQB typing of Hispanic American patients with rheumatoid arthritis: the "shared epitope" hypothesis may not apply. *J Rheumatol.* 1996 Aug;23(8):1363-8.
81. del Rincon I, Escalante A. HLA-DRB1 alleles associated with susceptibility or resistance to rheumatoid arthritis, articular deformities, and disability in Mexican Americans. *Arthritis Rheum.* 1999 Jul;42(7):1329-38.
82. Irigoyen P, Lee AT, Wener MH, Li W, Kern M, Batliwalla F, et al. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum.* 2005 Dec;52(12):3813-8.
83. Massardo L, Gareca N, Cartes MA, Cervilla V, Gonzalez A, Jacobelli S. The presence of the HLA-DRB1 shared epitope correlates with erosive disease in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2002 Feb;41(2):153-6.
84. Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Fronza LS, Bertolo MB, et al. Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol.* 2011 Jun;51(3):207-19.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com AR

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DOS ALELOS DE HLA-DRBI EM PACIENTES
BRASILEIROS COM ARTRITE REUMATÓIDE**

Você _____, está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) em um estudo, tendo o direito de estar ciente dos procedimentos que serão realizados.

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença caracterizada pela inflamação das articulações (juntas) periféricas, principalmente, nas mãos e pés. Apesar dos avanços científicos recentes, a causa desta enfermidade permanece desconhecida. Muitos fatores estão implicados na progressão da artrite reumatóide, dentre eles estão os fatores genéticos. O objetivo deste trabalho é estudar a frequência de diferentes alelos HLA-DRB1 nos pacientes com AR.

Serão convidados a participar desta pesquisa 367 pacientes consecutivos do ambulatório de Artrite Reumatóide, da Disciplina de Reumatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (Rio de Janeiro), Hospital da UNIFESP (São Paulo). Todos os pacientes do estudo terão uma ficha preenchida com seus dados clínicos e demográficos. Serão realizadas, no mesmo dia, radiografias de mãos e pés e coletado sangue para exames de laboratório (sorológicos e genéticos). As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Não haverá despesa pessoal para o participante em qualquer parte do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Os responsáveis por este estudo comprometem-se a utilizar o material coletado somente para esta pesquisa.

Caso existam dúvidas sobre este estudo, o responsável pela pesquisa é Prof. Dr. Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro e Dra. Magali J.Gómez Usnayo que podem ser encontrado no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) – Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), localizado no Boulevard 28 de Setembro, 77 sala 333 – Vila Isabel – Rio de Janeiro – RJ – Cep 20551-030 ou pelo telefone (21) 2587-6316 ou 2587-6846.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPE – UERJ, localizado no Boulevard 28 de Setembro, 77 térreo – Vila Isabel – Rio de Janeiro – RJ – Cep 20551-030 ou pelo telefone (21) 2587- 6353.

Eu, abaixo assinado, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, a metodologia realizada, a garantia de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Data/...../.....

Assinatura do paciente / representante legal
Registro no HUPE:

Data/...../.....

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data/...../.....

Assinatura do pesquisador-responsável

APÊNDICE B - Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com artrite reumatóide

**ESTUDO DA FREQUENCIA DOS ALELOS DE HLA-DRBI EM PACIENTES
BRASILEIROS COM ARTRITE REUMATÓIDE**

Data ____/____/____ Centro: _____ Ficha: _____ Médico _____

Nome do Paciente _____ Registro: _____
Endereço: _____ Cidade: _____ Estado: ____ CEP
_____ - _____ Telefone () _____ Tel. recado () _____ (nome: _____)

Data de Nascimento: ____/____/____; Sexo: () Feminino () Masculino; Naturalidade (UF): _____
Cor: () Branca; () Preta; () Parda; () Amarela; () Obs _____

Ascendencia

Asiático (Oriental) (): Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()
Caucasóide (Branco) (): Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()
Indígena (): Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()
Negro (): Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()
Outra _____ Pais/Região _____ Pai () Mãe () Avos () Bisavos ()

Estado Civil: () Casada / União estável; () Solteira ; () Separada / Divorciada; () Viúva;

Profissão / Ocupação: _____ () do lar ativa; () do lar inativa; () Autônomo ativo () Autônomo inativo; ()
Empregado; () Desempregado; () Aposentado por Idade; () Aposentado por Doença () Benefício temporário

Escolaridade () Analfabeto; () 1ºGrau completo; () 1ºGrau incompleto (até que série concluiu? _____);
() 2ºGrau completo; () 2ºGrau incompleto (até que série concluiu? _____); () Superior; () Pós-Graduação

Renda Familiar (número de salários mínimos): _____ Número de familiares que moram na casa: _____

Tabagismo: () atual () passado () início antes da AR; () início depois da AR; () Nunca

Tempo desde o início dos sintomas: _____ Tempo do início dos sintomas ao diagnóstico: _____

Tempo do início dos sintomas ao primeiro DMARD (meses): _____ Qual foi o DMARD? _____

Modo de Início: () Agudo (Dias); () Insidioso (Meses); () Palindrômico;
() Monoarticular; () Oligoarticular; () Poliarticular
() Simétrico; () Assimétrico

Manifestações Gerais: () febre; () emagrecimento; () fadiga; () Outra

História familiar de Doença Reumática Auto-imune:() Sim () Não Qual: _____ Parentesco: _____

CRITÉRIOS DA ACR para a classificação da Artrite Reumatóide (1987)

- | | |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1. Rigidez matinal > 1 hora por, | S () N () |
| 2. Edema de 3 ou + articulações | S () N () |
| 3. Edema de punhos, metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais | S () N () |
| 4. Edema articular simétrico | S () N () |
| 5. Rx mostrando osteopenia peri-articular ou erosão articular | S () N () |
| 6. Presença de nódulo reumatóide | S () N () |
| 7. Fator reumatóide sérico positivo | S () N () |

Obs: Os itens 1, 2, 3 e 4 precisam estar presentes por, no mínimo, 6 semanas

MANIFESTAÇÕES EXTRA-ARTICULARES (em qualquer época desde início da doença):

Oculares () episclerite () esclerite () ceratoconjuntivite seca () uveíte anterior
 Mucosa oral () xerostomia
 Cutâneas () Raynaud () vasculite digital () úlcera cutânea () nódulos subcutâneos () eritema palmar
 Cardíacas () pericardite
 Pulmonares () derrame pleural () pneumopatia intersticial () nódulo pulmonar
 Neurológicas () neuropatia periférica () Síndrome do túnel do carpo
 Hematológicas () anemia (Hb < 12 mg%) Outras _____

PASSADO DE CIRURGIA ORTOPÉDICA: (QUAL?): _____
DOENÇAS ASSOCIADAS _____

CAPACIDADE FUNCIONAL – ACR – STEINBROCKER

- () Classe I – Realiza todas as atividades usuais da vida diária sem limitação (pessoais, profissionais e recreativas)
 () Classe II – Limitado para atividades recreativas ou esportivas (apresenta dor em 1 ou + articulações)
 () Classe III – Limitado para atividades profissionais, recreativas e esportivas
 () Classe IV – Limitado para as atividades usuais da vida diária (pessoais, profissionais e recreativas)

EXAMES COMPLEMENTARES

VHS: _____ mm/1ª hora;

PCR: _____ mg/dl;

FR: _____ UI/mL;

CCP: _____ UI/mL;

() SOROTECA (número de vials): _____

() HLA-DRB1* 0401; () HLA-DRB1* 0404; () HLA-DRB1* 0101; () _____; () _____

() DNATECA;

() Radiografia de mãos (dorso-palmar)

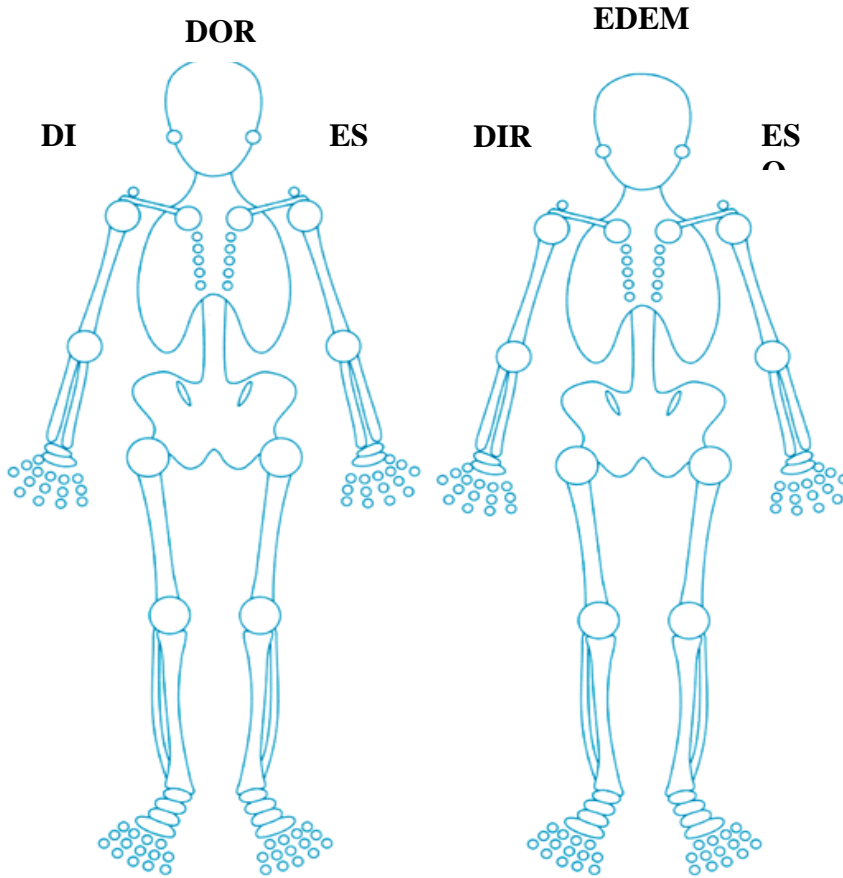
Espaço Articular: _____ / Erosão: _____ / Escore de vHSharp: _____ ()

Radiografia de pés (dorso-plantar)

Espaço Articular: _____ / Erosão: _____ / Escore de vHSharp: _____

Medicamento	Atual			Passado	
	Nome	Dose	Tempo	Dose Acumulada	Tempo
Analgésico:					
AINE:					
Coxibe:					
Corticosteróide:					
Cloroquina:					
Hidroxicloroquina					
Metotrexato (VO):					
Metotrexato (SC):					
Sulfasalazina:					
Leflunomida:					
Azatioprina:					
Sais de Ouro:					
Ciclosporina:					
Anti-TNF:					

Nome: _____ Registro: _____ Ficha: _____ Data: __ / __ / __



NAD =
NAD ₂₈ =
NAE =
NAE ₂₈ =
AD _ç MD (0-100) =
AD _ç PAC (0-100) =
EVA _{DOR} (0-100) =
AGS _{PAC} (0-100) =
DAS ₂₈ =
HAQ (0 - 3) =
SF-36 FÍSICO =
SF-36 MENTAL =

Médico (AD_çMD)
 0 _____ 100
 Sem Atividade _____ Atividade Máxima

Paciente (AD_çPac, Dor e AGSPac)

0 _____ 100
 Sem Atividade _____ Atividade Máxima

0 _____ 100
 Sem Dor _____ Pior Dor Possível

0 _____ 100
 Muito Bem _____ Muito Mal

NAD/E = número de articulações dolorosas/edemaciadas
 NAD₂₈/E₂₈ = número de articulações(28) dolorosas/edemaciadas
 AD_çMD = Avaliação da atividade de doença pelo médico (no momento da consulta)
 AD_çPac = Avaliação da atividade de doença pelo paciente (no momento da consulta)
 DOR = Escala visual analógica de dor (na última semana)
 AGSPac = Avaliação global do estado de saúde pelo paciente (no momento da consulta)
 HAQ = Health Assessment Questionnaire
 SF-36 físico/mental = Componente físico e mental do S

APÊNDICE C– Termo de consentimento livre e esclarecido para o grupo controle

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DOS ALELOS DE HLA-DRB1 EM PACIENTES
BRASILEIROS COM ARTRITE REUMATÓIDE**

Você _____, está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) em um estudo, tendo o direito de estar ciente dos procedimentos que serão realizados.

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença caracterizada pela inflamação das articulações (juntas) periféricas, principalmente, nas mãos e pés. Apesar dos avanços científicos recentes, a causa desta enfermidade permanece desconhecida. O objetivo deste estudo é Estudar a freqüência de diferentes alelos HLA-DRB1 nos pacientes com AR do Hospital Universitário Pedro Ernesto do Rio de Janeiro.

Serão convidados a participar desta pesquisa 367 pacientes consecutivos do ambulatório de Artrite Reumatóide, da Disciplina de Reumatologia e 367 voluntários de 30 a 55 anos da campanha de doadores de medula óssea os quais participaram como grupo controle neste estudo. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Os pacientes do grupo controle, serão entrevistados e examinados com a finalidade de obter: dados demográficos e clínicos para afastar a presença de AR nestes pacientes. Os pacientes selecionados serão submetidos à coleta de sangue para determinação do HLA-DRB1. Não haverá despesa pessoal para o participante em qualquer parte do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Os responsáveis por este estudo comprometem-se a utilizar o material coletado somente para esta pesquisa.

Caso existam dúvidas sobre este estudo, o responsável pela pesquisa é Prof. Dr. Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro e Dra Magali J. Gómez Usnayo que poderam ser encontrado no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) – Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), localizado no Boulevard 28 de Setembro, 77 sala 333 – Vila Isabel – Rio de Janeiro – RJ – Cep 20551-030 ou pelo telefone (21) 2587-6316 ou 2587-6846.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPE – UERJ, localizado no Boulevard 28 de Setembro, 77 térreo – Vila Isabel – Rio de Janeiro – RJ – Cep 20551-030 ou pelo telefone (21) 2587- 6353.

Eu, abaixo assinado, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, a metodologia realizada, a garantia de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

_____ Data/...../.....
Assinatura voluntário

_____ Data/...../.....
Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ Data/...../.....
Assinatura do pesquisador-responsável

APÊNDICE D - Ficha para o grupo controle**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DOS ALELOS DE HLA-DRBI EM PACIENTES BRASILEIROS
COM ARTRITE REUMATÓIDE**

Data: ____/____/____ Registro: _____ Médico: _____

Nome do Paciente: _____ Registro: _____

Endereço: _____ Cidade: _____ Estado: __ CEP: _____
- _____ Telefone () _____ Tel. recado () _____ (nome: _____)

Data de Nascimento: ____/____/____ ; Idade: _____ Sexo: () Feminino () Masculino; Naturalidade (UF): _____;

Cor: () Branca; () Preta; () Parda; () Amarela; () Indígena. Outras: _____

Ascendência :

Asiático(Oriental) (): Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()

Caucasóide (Branco) (): Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()

Indígena (): Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()

Negro (): Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()

Outra _____ Pais/Região _____ Pai() Mãe () Avos () Bisavos ()

Est Civil:()Casada/União estável; ()Solteira (nunca casou ou teve união estável); ()Separada/Divorciada; ()Viúva;

Profissão / Ocupação: _____ () do lar ativa; () do lar inativa; () Autônomo ativo ()

Autônomo inativo; () Empregado; () Desempregado; () Aposentado por Idade; () Aposentado por Doença () Benefício temporário

Escolaridade () Analfabeto; () 1ºGrau completo; () 1ºGrau incompleto (até que série concluiu? _____);

() 2ºGrau completo; () 2ºGrau incompleto (até que série concluiu? _____); () Superior; () Pós Graduação;

Renda Familiar (número de salários mínimos): _____ Número de familiares que moram na casa: _____

Tabagismo: () atual () passado () Nunca; Carga tabágica: _____(maço/ano)

Queixas Articulares :

Passada

Dor articular: () Não () Sim () Não () Sim

Dor articular em mais de uma articulação: () Não () Sim. Quantas? ____ () Não () Sim. Quantas? ____

Dor articular mais sinovite: () Não () Sim. Quantas? ____ () Não () Sim. Quantas? ____

Em caso de dor em mais de 2 articulações com sinovite. Tem ou já teve? :

1. Rigidez matinal > 1 hora por, S () N ()

2. Edema de 3 ou + articulações S () N ()

3. Edema de punhos, metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais S () N ()

4. Edema articular simétrico S () N ()

5. Presença de nódulo reumatóide S () N ()

6. Fator reumatóide positivo S () N ()

7. Raios X (alterações compatível com AR) S () N ()

Outros diagnósticos:

Auto-declarado: _____

Hipótese Diagnóstica: _____

História familiar de Doença Reumática Auto-imune:() Sim () Não Qual: _____ Parentesco: _____

DOENÇAS ASSOCIADAS: _____

APÊNDICE E – Artigo científico publicado

ARTIGO ORIGINAL

Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com artrite reumatoide

Magali Justina Gómez Usnayo¹, Luis Eduardo Coelho Andrade²,
Renata Triguinho Alarcon³, Juliana Cardoso Oliveira⁴, Gustavo Milson Fabrício Silva⁴,
Izidro Bendet⁵, Rufus Burlingame⁶, Luis Cristóvão Porto⁷, Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro⁸

RESUMO

Os alelos HLA-DRB1, que codificam uma sequência de aminoácidos (QKRAA/QRRAA/RRRAA) nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável da cadeia β 1 do gene DRB1, denominada epítipo compartilhado (EC), estão associados a maior suscetibilidade e gravidade para artrite reumatoide (AR) em diversas populações. **Objetivo:** Determinar a frequência dos alelos HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com AR, e sua associação a fator reumatoide (FR) e anticorpos antipeptídeos citrulinados (ACPA). **Material e métodos:** Foram incluídos 412 pacientes com AR e 215 controles. A tipificação HLA-DRB1 foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando *primers* específicos e hibridização com oligonucleotídeos de sequência específica (SSOP). A pesquisa de ACPA foi determinada pela técnica de ELISA, e a do FR por nefelometria. Para análises estatísticas foram utilizados os testes do qui-quadrado e *t* de Student e a regressão logística. **Resultados:** Alelos HLA-DRB1*04:01, *04:04 e *04:05 associaram-se à AR ($P < 0,05$); a despeito do amplo intervalo de confiança, vale a pena ressaltar a associação observada entre o alelo DRB1*09:01 e a doença ($P < 0,05$). Alelos HLA-DRB1 EC+ foram observados em 62,8% dos pacientes e em 31,1% do grupo-controle (OR 3,62; $P < 0,001$) e estiveram associados a ACPA (OR 2,03; $P < 0,001$). Alelos DRB1-DERAA mostraram efeito protetor para AR (OR 0,42; $P < 0,001$). **Conclusão:** Em uma amostra de pacientes brasileiros com AR de etnia majoritariamente mestiça, alelos HLA-DRB1 EC+ estiveram associados à suscetibilidade à doença e à presença de ACPA.

Palavras-chave: HLA-DRB1, epítipo compartilhado, artrite reumatoide, polimorfismo gênico, imunogenética.

© 2011 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica crônica, caracterizada pelo acometimento inflamatório da membrana sinovial das articulações, levando à destruição óssea e cartilaginosa. Sua prevalência na população adulta mundial é de 0,5% a 1%, e no Brasil é de 0,46%.¹ Apresenta pico de incidência

entre a quarta e a sexta décadas, e é duas a três vezes mais frequente em mulheres que em homens.²

Embora sua etiologia permaneça desconhecida,³ vários estudos sugerem que uma combinação de fatores genéticos e ambientais esteja envolvida. O fator genético contribui com cerca de 60% da suscetibilidade para AR.⁴ Embora o papel da hereditariedade não esteja completamente compreendido,

Recebido em 19/6/2011. Aceito, após revisão, em 21/6/2011. Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse. Comitê de Ética: CEP-HUPE 2169. Apoio financeiro: Centro de Estudos em Reumatologia Pedro Ernesto – CERPE.

Disciplina de Reumatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ.

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ

2. Professor-Associado da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

3. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Reumatologia da UNIFESP

4. Biólogo-Assistente do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ e Doutorando do Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da UERJ

5. Consultor Científico de Imunologia do Sérgio Franco Medicina Diagnóstica – DASA

6. Cientista sênior da INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, California, EUA

7. Professor Titular do Departamento de Histologia e Embriologia e Coordenador do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da UERJ

8. Professor Adjunto da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ

Correspondência para: Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro. Boulevard 28 de Setembro, 77 – sala 333 – Vila Isabel. CEP: 20551-030. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Telefone: +55 21 2868-8216. Email: geraldo.castelar@gmail.com

o fator de risco predominante, responsável por 30% a 50% do componente genético, parece estar ligado aos antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês, *human leukocyte antigen*). O HLA localiza-se no complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*) presente no braço curto do cromossoma 6 (6p21.3).⁵ Um grupo de alelos do locus HLA-DRB1 (DRB1*01:01, DRB1*01:02, DRB1*04:01, DRB1*04:04, DRB1*04:05, DRB1*04:08, DRB1*04:10, DRB1*10:01, DRB1*14:02) codifica uma sequência de aminoácidos compartilhada (QKRAA/QRRA/RRRA, onde Q = glutamina; K = lisina; R = arginina e A = alanina), localizada no sulco de ligação ao peptídeo, nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável da molécula HLA-DR, sequência esta denominada de epitopo compartilhado (EC).⁶

Acredita-se que o EC esteja envolvido na patogênese da AR, por servir de local de ligação no processo de apresentação de peptídeos artritogênicos para as células T CD4⁺ envolvidas na resposta imunoinflamatória dessa doença. Além disso, o EC pode estar envolvido no processo de indução de algumas células B a diferenciarem-se em plasmócitos, levando à formação dos anticorpos anti-peptídeos citrulinados (ACPA, do inglês, *anti-citrullinated peptides antibody*).⁷ Além do seu papel na suscetibilidade para AR, alelos que contêm as sequências do EC (principalmente homozigotos) estão associados às formas mais graves da enfermidade e às manifestações extra-articulares,⁸ bem como à presença de doença erosiva.^{9,10}

Estudos realizados em diversos grupos étnicos mostram a existência de variações consideráveis com relação à associação dos alelos de HLA-DRB1 com a suscetibilidade à AR.¹¹ Alelos HLA-DRB1*04:01 e *04:04 estão associados à suscetibilidade à doença em indivíduos caucasianos do norte da Europa e dos Estados Unidos;¹² o DRB1*04:05 em coreanos, japoneses e chineses;^{13,14} o DRB1*01:01 e o *10:01 em gregos, espanhóis e judeus israelenses;^{15,16} o DRB1*14:02 em índios nativos americanos, peruanos^{17,18} e equatorianos;¹⁹ o DRB1*04:04 em colombianos e argentinos.^{20,21} No Brasil, Bertolo *et al.*²² observaram associação da AR ao DRB1*01:01 e *01:02 em 65 pacientes caucasianos. Mais recentemente, Louzada-Junior *et al.*²³ encontraram associação da doença aos alelos DRB1*04:01, *04:04, *04:05, *01:01 e *10:01 em 140 pacientes, de maioria étnica caucasiana.

Em contrapartida, os alelos HLA-DRB1, com uma sequência de aminoácidos comum, DERRA (D = ácido aspártico, E = ácido glutâmico, R = arginina, A = alanina), expressa nos alelos DRB1*01:03, *04:02, *11:02, *11:03, *13:01, 13:02 e *13:04, parecem estar associados a menor risco para o desenvolvimento da AR, independentemente da presença do EC.

A presença desses alelos parece também ser protetora contra doença erosiva grave, mesmo em pacientes com ACPA.^{24,25}

Os principais marcadores imunológicos da AR, fator reumatoide (FR) e ACPA, aparentemente também estão envolvidos na patogênese da sinovite reumatoide. A presença de títulos elevados de ambos foi associada à doença mais agressiva e erosiva.^{26,27}

Alguns estudos em pacientes com AR têm mostrado resultados contraditórios com relação à associação do EC e à positividade do FR.^{28,29} Ao mesmo tempo, parece haver uma associação dos alelos EC+ apenas em pacientes com AR que apresentam ACPA positivos,³⁰ e que essa associação seria mais intensa com ACPA que com a própria AR.³¹ Tal associação sugere que os alelos EC poderiam influenciar a apresentação do antígeno levando à produção de ACPA. Mais recentemente, foi observado que o risco conferido pelo tabagismo, principal fator ambiental, é particularmente elevado nos indivíduos que possuem alelos HLA-DR EC+ com ACPA.³²

Tendo em conta a diversidade dos resultados da literatura referentes à associação de alelos HLA-DRB1 à AR em diferentes etnias, o objetivo do presente estudo foi determinar a associação entre esses alelos e a AR, incluindo a presença de FR e/ou ACPA em uma população de pacientes brasileiros altamente miscigenados.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e controle

Nosso estudo foi tipo caso-controle, em que foram incluídos pacientes com AR. Todos preencheram pelo menos quatro dos sete critérios para classificação diagnóstica da AR estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (ACR).³³ Os pacientes selecionados não apresentavam outras doenças autoimunes e eram acompanhados regularmente nos ambulatórios de AR das disciplinas de Reumatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), e do Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), de outubro de 2007 a agosto de 2009. No grupo-controle foram incluídos indivíduos doadores voluntários de medula óssea, de campanhas de doação realizadas em diferentes bairros do Rio de Janeiro, de maio de 2008 a novembro de 2009. A faixa etária dos doadores foi de 18 a 55 anos, eram de ambos os gêneros e não apresentavam queixa atual ou passada de artrite. Também não foram incluídas pessoas com história familiar de AR ou outras doenças autoimunes em parentes de primeiro grau. Foram selecionados os maiores de 30 anos, para minimizar o viés de análise quanto ao possível diagnóstico futuro dessa doença neste grupo.

Após serem informados sobre a natureza do estudo e terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os participantes foram submetidos a uma entrevista clínica, com ficha padronizada para os dois grupos. Foram registrados dados demográficos para ambos os grupos, além de características clínicas para o grupo dos pacientes. Ambos os grupos tiveram amostra de sangue coletada para tipificação do HLA. O grupo de pacientes foi submetido, também, à detecção de autoanticorpos (FR e ACPA).

Os grupos foram pareados para gênero e etnia. A atribuição da origem étnica foi realizada pelo mesmo investigador, após solicitar aos pacientes e doadores voluntários dados sobre sua ascendência. Foi considerado de etnia negra ou caucasiana aquele indivíduo com os quatro avôs com ascendência negra ou caucasiana, respectivamente, e mestiço quando pelo menos um dos avôs era de etnia diferente. Não foram incluídos descendentes de asiáticos, com a finalidade de evitar vies de seleção.

Em ambos os grupos foram excluídos os indivíduos que não possuíam quantidade de DNA ou soro suficientes para uma adequada análise da tipificação do HLA ou dosagem dos autoanticorpos. Não foram incluídas também pessoas cuja tipificação mostrou resultado ambíguo.

Tipificação HLA-DRB1

Os alelos HLA-DRB1 foram determinados para todos os pacientes com AR e controles. A tipificação HLA foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando *primers* específicos e hibridização com oligonucleotídeos de sequência específica ((SSOP, do inglês, *sequence-specific oligonucleotide probe*) (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, EUA).

Definição dos alelos HLA-DRB1 de risco para AR

Todo indivíduo com tipificação para os alelos HLA-DRB1*01:01, *01:02, *04:01, *04:04, *04:05, *04:08, *04:10, *10:01 e *14:02 foi considerado portador do epítipo compartilhado (EC+), podendo ser em uma dose (EC+/-) ou dose dupla (EC+/+). Associações de risco para AR entre alelos HLA-DRB1 foram realizadas a partir de combinações genotípicas estabelecidas na ausência de EC (-/-), na presença de uma dose do EC (+/-) ou de dose dupla do EC (+/+). A associação do HLA-DRB1 com as características sorológicas nos pacientes com AR também foi realizada.

Definição dos alelos HLA-DRB1 de proteção para AR

Todo indivíduo com tipificação para os alelos HLA-DRB1*01:03, *04:02, *11:02, *11:03, *13:01, *13:02 e *13:04 foi definido

como portador da sequência DERAA (protetora), podendo ser em uma dose ou em dose dupla.

Os indivíduos cuja tipificação compreendia alelos não pertencentes à sequência do EC ou à sequência DERAA foram definidos com X, podendo estar em uma dose ou em dose dupla.

Assim, formaram-se seis grupos de indivíduos para análise, de acordo com a presença dos alelos DRB1:

Grupo A: dose dupla (homozigotos) para EC (EC/EC);

Grupo B: dose única (heterozigoto) alelo EC (EC/X);

Grupo C: dose única de EC e de DERAA (EC/DERAA);

Grupo D: ausência de EC e de DERAA (X/X);

Grupo E: dose única de DERAA (DERAA/X);

Grupo F: dose dupla de DERAA (DERAA/DERAA).

Determinação de FR e ACPA

A detecção do ACPA foi realizada empregando o QUANTA Lite® de 2ª geração CCP ELISA (INOVA Diagnostics, Inc – San Diego, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de FR IgM foi realizada pela técnica de nefelometria (Dade Behring Marburg GmbH – Alemanha). Para o FR IgM foram considerados positivos títulos > 20 UI/mL, e elevados quando > 100 UI/mL. Para o ACPA foram considerados positivos títulos > 20 U/mL, e elevados quando > 60 U/mL.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa Epi Info 6. A análise da associação entre as variáveis categóricas foi feita pelo teste do qui-quadrado (com correção de Yates) ou teste exato de Fisher. As variáveis quantitativas com distribuição normal foram testadas utilizando-se teste *t* de Student para amostras independentes ou Mann-Whitney e análises de variância. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Análise de regressão logística foi utilizada para categorizar o risco de associação dos alelos HLA-DRB1.

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 412 (95%) dos 430 pacientes com AR e 215 (74%) dos 290 controles doadores voluntários de medula óssea. As características de gênero e etnia foram similares em ambos os grupos ($P = 0,722$ e $P = 0,552$). Os demais dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com AR e do grupo-controle encontram-se descritos na Tabela 1.

Associação de grupos alélicos HLA-DRB1 com AR

A Tabela 2 mostra a distribuição das frequências de grupos alélicos do HLA-DRB1 e a associação à suscetibilidade e proteção para AR entre 412 pacientes com AR e 215 voluntários do grupo-controle. Alelos HLA-DRB1*04 (OR = 2,69),

*09 (OR = 5,19) e *14 (OR = 2,26) estiveram associados à suscetibilidade à AR (P < 0,05), enquanto os alelos DRB1*11 (OR = 0,45) e *13 (OR = 0,53) estiveram associados à proteção ao desenvolvimento da AR (P < 0,05). De forma semelhante, quando realizamos a tipificação dos alelos HLA-DRB1 por alta

Tabela 1

Caracterização demográfica e clínico-laboratorial de pacientes com AR e grupo-controle

Variável	AR (n = 412)	Controle (n = 215)	P
Idade (média ± DP, anos)	51,8 ± 11,5/52,5	42,6 ± 5,4	< 0,001
Gênero feminino (%)	376 (90,8)	198 (92,1)	0,722
Etnia			0,552
Mestiços (%)	272 (66)	147 (68,4)	
Branco (%)	111 (27)	58 (27)	
Negro (%)	29 (7)	10 (4,7)	
Tempo de doença (média ± DP, anos)	9,2 ± 7,5	—	
FR+ (%)	257 (62,5)	—	
Titulação do FR (média ± DP, UI/mL)	288 ± 668	—	
ACPA+ (%)	294 (71,3)	—	
TTitulação do ACPA (média ± DP, U/mL)	135 ± 51,5	—	

AR: artrite reumatoide; ACPA: anticorpo antipeptídeo citrulinado; FR: fator reumatoide; DP: desvio-padrão.

Tabela 2

Frequências dos grupos alélicos do HLA-DRB1 (baixa resolução) em pacientes com AR e grupo-controle

Grupo alélico	AR = 412, n(%)	Controle = 215, n(%)	OR	95% IC	P
*01	113 (14)	45 (10,5)	1,36	0,93-2,00	NS
*03	73 (9)	54 (12,5)	0,68	0,46-1,00	NS
*04	186 (22,5)	42 (10)	2,69	1,86-3,92	0,001
*07	79 (9,5)	52 (12)	0,77	0,52-1,14	NS
*08	38 (5)	20 (5)	0,99	0,55-1,79	NS
*09	29 (3,5)	3 (1)	5,19	1,50-21,49	0,004
*10	27 (3)	14 (3)	1,01	0,50-2,04	NS
*11	53 (6)	57 (13)	0,45	0,30-0,68	0,001
*12	12 (1,5)	9 (2)	0,69	0,27-1,79	NS
*13	85 (10)	77 (18)	0,53	0,37-0,75	0,001
*14	38 (5)	9 (1)	2,26	1,04-5,09	0,038
*15	64 (8)	43 (10)	0,76	0,50-1,16	NS
*16	27 (3)	11 (2,5)	1,29	0,61-2,80	NS
TOTAL	824	430			

AR: artrite reumatoide; OR: razão de risco; NS: não significante.

Tabela 3
 Frequência alélica do HLA-DRB1 em pacientes com AR e grupo-controle

Alelos HLA-DRB1	AR = 824, n(%)	Controle = 430, n(%)	OR	95% IC	P
*01:01	68 (8,3)	26 (6)	1,40	0,86-2,29	NS
*01:02	41 (5)	17 (4)	1,27	0,69-2,36	NS
*01:03	4 (0,5)	2 (0,5)	1,04	0,16-8,22	NS
*03	73 (8,8)	54 (12,5)	0,68	0,46-1,00	NS
*04:01	41 (5)	8 (1,9)	2,76	1,23-6,44	0,010
*04:02	14 (1,7)	5 (1,2)	1,47	0,49-4,70	NS
*04:03	9 (1,1)	5 (1,2)	0,94	0,29-3,23	NS
*04:04	42 (5)	6 (1,4)	3,80	1,53-10,0	0,002
*04:05	48 (5,8)	10 (2,3)	2,60	1,25-5,53	0,007
*04:06	3 (0,4)	1 (0,2)	1,57	0,15-39,2	NS
*04:07	7 (0,8)	3 (0,7)	1,22	0,28-5,97	NS
*04:08	12 (1,5)	0 (0,0)	ND	ND	NS
*04:10	3 (0,4)	0 (0,0)	ND	ND	NS
*04:11	7 (0,8)	4 (0,9)	0,91	0,24-3,72	NS
*07	79 (9,6)	52 (12,1)	0,77	0,52-1,14	NS
*08	38 (4,6)	20 (4,7)	0,99	0,55-1,79	NS
*09:01	29 (3,5)	3 (0,7)	5,19	1,50-21,49	0,004
*10:01	27 (3,3)	8 (1,9)	1,79	0,77-4,31	NS
*11	53 (6,4)	57 (13,2)	0,45	0,30-0,68	0,001
*12	12 (1,4)	9 (2,1)	0,69	0,27-1,79	NS
*13	85 (10,3)	77 (17,9)	0,53	0,37-0,75	0,001
*14:01	20 (2,4)	6 (1,4)	1,76	0,66-4,92	NS
*14:02	18 (2,2)	3 (0,7)	3,18	0,88-13,63	NS
*15	64 (7,8)	43 (10)	0,76	0,50-1,16	NS
*16	27 (3,3)	11 (2,6)	1,29	0,61-2,80	NS

AR: artrite reumatoide; OR: razão de risco; NS: não significante.

resolução (Tabela 3), a análise das frequências alélicas mostrou que os alelos *DRB1*04:01 (OR = 2,76), *04:04 (OR = 3,80), *04:05 (OR = 2,60) e *09:01 (OR = 5,19) estiveram associados à suscetibilidade à AR (P < 0,05).

Associação dos alelos HLA-DRB1 do EC na suscetibilidade à AR

A Tabela 4 mostra a distribuição de pacientes com AR e indivíduos do grupo-controle de acordo com a presença dos alelos HLA-DRB1 EC+. Observamos maior frequência de genótipos heterozigotos (51%) que homozigotos (11%) no grupo de pacientes, estando ambos associados à

suscetibilidade à AR (OR = 2,90, P < 0,001 e OR = 2,27, P < 0,001, respectivamente). Por fim, observamos frequência aumentada do EC no grupo de pacientes com AR (62,8%) quando comparados com os controles (31,1%), conferindo um OR = 3,59 (P = 0,05).

A análise de regressão logística dos dados dos pacientes com AR e grupo-controle com genótipos homozigotos e heterozigotos HLA-DRB1 com EC+ e DRB1 sem EC- mostrou risco aumentado para a doença de 3,86 vezes mais entre pacientes que apresentam genótipos homozigotos (IC 95% 1,84-8,24; P < 0,001), e de 3,54 vezes mais entre os que apresentam genótipos heterozigotos (IC 95% 2,40-5,21; P < 0,001).

Tabela 4

Especificidades individuais de HLA-DRB1 associados à AR entre brasileiros de acordo com genótipos relacionados à presença do EC

EC e genótipo	AR = 412, n(%)	Controle = 215, n(%)	OR	95% IC	P
Alelos EC+/EC-	210 (51)	56 (26)	2,90	1,99-4,23	< 0,001
*01:01	48 (11,6)	18 (8,3)	1,44	0,79-2,65	0,257
*01:02	32 (7,7)	11 (5,1)	1,56	0,74-3,37	0,280
*04:01	23 (5,5)	6 (2,7)	2,06	0,78-5,74	0,167
*04:04	27 (6,5)	4 (1,8)	3,70	1,21-12,54	0,017
*04:05	35 (8,4)	7 (3,2)	2,76	1,15-6,94	0,020
*04:08	8 (1,9)	—	NS	—	0,092
*04:10	3 (0,7)	—	NS	—	0,519
*10:01	21 (5)	7 (3,2)	1,60	0,63-4,20	0,392
*14:02	13 (3,1)	3 (1,3)	2,30	0,61-10,28	0,289
Alelos EC+/ EC+	45 (11)	11 (5)	2,27	1,11-4,77	0,023
*01:01/*01:01	1 (0,2)	1 (0,4)	NS	NS	NS
*01:02/*01:02	1 (0,2)	1 (0,4)	NS	NS	NS
*04:01/*04:01	1 (0,2)	—	NS	NS	NS
*04:04/*04:04	3 (0,7)	—	NS	NS	NS
*04:05/*04:05	1 (0,2)	—	NS	NS	NS
*14:02/*14:02	1 (0,2)	—	NS	NS	NS
*01:01/*04:01	8 (1,9)	2 (0,9)	2,11	0,41-14,50	0,532
*01:01/*04:04	3 (0,7)	—	NS	NS	NS
*01:01/*04:05	3 (0,7)	2 (0,9)	NS	NS	NS
*01:01/*10:01	2 (0,5)	—	NS	NS	NS
*01:02/*04:01	2 (0,5)	—	NS	NS	NS
*01:02/*04:04	3 (0,7)	1 (0,9)	NS	NS	NS
*04:01/*04:05	3 (0,7)	1 (0,9)	NS	NS	NS
*04:01/*10:01	2 (0,5)	—	NS	NS	NS
*04:05/*10:01	2 (0,5)	—	NS	NS	NS
Outros	9 (2,2)	3 (1,3)	1,58	0,39-7,43	0,705
Total EC+	255 (62,8)	67 (31,1)	3,59	2,49-5,17	< 0,001

AR: artrite reumatoide; EC+: epítipo compartilhado positivo; EC-: epítipo compartilhado negativo; OR: razão de risco; NS: não significante.

Associação dos alelos HLA-DRB1-DERAA na proteção ao desenvolvimento da AR

Avaliando a influência da presença de alelos DERAA, observamos que 79 (19%) pacientes com AR e 78 (36%) controles possuem os alelos de HLA-DRB1 codificando DERAA, o que indica que sua presença confere proteção para AR (OR = 0,42; IC 95% 0,28-0,61; P < 0,001).

O efeito de alelos DERAA na ausência de alelos EC foi avaliado comparando os grupos D (X/X) e E (X/DERAA) mais o grupo F (DERAA/DERAA). Indivíduos com DERAA positivo tiveram menor risco para desenvolver AR (OR = 0,56; IC 95% 0,34-0,92; P = 0,021).

A comparação entre os grupos B (EC/X) e C (EC/DERAA) revelou que, na presença de um alelo EC, a codificação de alelos DERAA conferiu menor suscetibilidade para AR, embora sem significância estatística (OR = 0,60; IC 95% 0,28-1,29; P = 0,216) (Tabela 5).

Tabela 5

Frequências de genótipos HLA-DRB1 de suscetibilidade (EC) e proteção (DERAA) em pacientes com AR e grupo-controle

Grupo	Genótipo HLA-DRB1	AR = 412, n(%)	Controle = 215, n(%)
A	EC/EC	45 (10,9)	11 (5,1)
B	EC/X	175 (43,2)	42 (19,5)
C	EC/DERAA	35 (7,7)	14 (6,5)
D	X/X	110 (26,6)	84 (39,1)
E	X/DERAA	43 (10,4)	57 (26,5)
F	DERAA/DERAA	4 (0,9)	7 (3,3)

Alelos EC são HLA-DRB1 *01:01, *01:02, *04:01, *04:04, *04:05, *04:08, *10:01 e *14:02. Alelos DERAA são HLA-DRB1 *01:03, *04:02, *11:02, *11:03, *13:01, *13:02 e *13:04. Alelos X são todos os outros alelos HLA-DRB1.

OR, IC 95% e valor P dos seguintes dados: Grupo B comparado ao grupo C: OR 0,60; IC 95% 0,28-1,29; P = 0,216. Grupo D comparado aos grupos E e F: OR 0,56; IC 95% 0,34-0,92; P = 0,021. Grupo A mais B comparado ao grupo D: OR 3,17; IC 95% 2,05-4,90; P = 0,00.

Tabela 6

Frequência de alelos HLA-DRB1 EC e autoanticorpos em 412 pacientes com AR

Autoanticorpos	EC+, n(%)	EC-, n(%)	OR	95% IC	P
Fator reumatoide			1,26	0,82-1,94	0,313
Positivo	165 (40,04)	92 (22,33)			
Negativo	91 (22,08)	64 (15,53)			
ACPA			2,03	1,28-3,31	0,001
Positivo	197 (47,81)	97 (23,54)			
Negativo	59 (14,32)	59 (14,32)			

EC+: epitopo compartilhado positivo; EC-: epitopo compartilhado negativo; ACPA: anticorpos antipeptídeo citrulinado; OR: razão de risco.

Associação entre alelos HLA-DRB1 de suscetibilidade (EC) e presença de autoanticorpos

Os pacientes com AR apresentaram FR positivo em 62,3% (n = 257) e ACPA positivo em 71,3% (n = 294) dos casos, dos quais 237 (57,5%) dos pacientes foram positivos para ambos os autoanticorpos e somente 57 pacientes (13,8%) foram positivos apenas para o ACPA. Observamos também uma associação significativa entre FR e ACPA (OR = 20,79; IC 95% 11,49-37,97; P < 0,001).

Expressavam FR+ e alelos HLA-DRB1 EC+ 165 (40,04%) pacientes, e 197 (47,81%) expressavam ACPA+ e alelos HLA-DRB1 EC+. Associação significativa foi observada somente para alelos EC com ACPA (Tabela 6).

Os níveis séricos do FR para o grupo de pacientes com genótipos EC homozigotos, heterozigotos e sem o EC foram 177,7 ± 286 UI/mL, 205,3 ± 695 UI/mL e 157,1 ± 328 UI/mL, respectivamente. Os níveis séricos médios para o ACPA, seguindo a mesma ordem do FR, foram 131,3 ± 66 U/mL, 102,8 ± 71 U/mL e 83,3 ± 73 U/mL, respectivamente.

DISCUSSÃO

Estudos genéticos realizados inicialmente em gêmeos e posteriormente em familiares demonstraram uma predisposição familiar para AR, representando 60% do risco total para o desenvolvimento da doença na população.⁴ Diversos estudos demonstraram que o fator genético mais importante associado à suscetibilidade da AR é a presença do HLA-DRB1 do MHC, descoberto inicialmente por Stastny *et al.*³⁴ e posteriormente organizado na hipótese do EC por Gregersen *et al.*⁶

Técnicas modernas como as empregadas em estudos de genoma completo (GWAS, do inglês, *genome-wide association studies*) e marcadores genéticos de polimorfismo de único nucleotídeo (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) confirmam a associação significante e preponderante desses alelos com a AR. No entanto, é importante ressaltar que a associação da AR ao HLA-DRB1 e a hipótese do EC não explicam toda a suscetibilidade genética conferida pelo HLA. Outros genes do HLA, sem EC, tais como os alelos HLA-DRB1*03:01, DRB1*07:01 e DRB1*09:01, embora com frequência menor, também foram associados à maior suscetibilidade para a AR.^{35,36}

Um segundo gene associado à doença é a proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN22, do inglês, *protein tyrosine phosphatase*), presente em 8% dos pacientes com AR.³² Em menor proporção, foram descritas associações a determinados alelos do sinal transdutor e ativador de transcrição 4 (STAT4, do inglês, *signal transducer and activator of transcription 4*), do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4, do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte antigen*), do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF, do inglês, *macrophag emigration inhibitory factor*) e da peptidilarginina deaminase 4 (PADI4, do inglês, *peptidylarginine deiminase type IV*).³⁷

No presente estudo observamos que 90,8% dos pacientes eram mulheres, semelhante à proporção encontrada no estudo realizado por Bertolo *et al.*²² em 2001 (84,6%) e por Louzada-Junior *et al.*²³ em 2008 (77,8%).

A influência da etnia é ponto fundamental quando se avalia a associação dos genes HLA com doenças, especialmente com AR. Além de ser um sistema altamente polimórfico, distintos alelos são associados à AR em diferentes populações. Dessa forma, ao estudar uma população altamente miscigenada como a brasileira, as associações tradicionais de determinadas etnias poderiam não ser verificadas. No intuito de controlar essa variável, todo estudo de associação HLA e doença necessita que os indivíduos-controle sejam oriundos do mesmo estrato sociogeográfico dos pacientes, a fim de preservar as influências sociais e demográficas em ambos os grupos. Nosso estudo, além de avaliar uma amostra significativa de pacientes com AR (n = 412), também tipificou indivíduos saudáveis (n = 215), todos provenientes da mesma região geográfica e estrato social. Além disso, houve predomínio de mestiços, seguido de brancos e negros, configurando-se uma amostra altamente miscigenada (descendentes principalmente de portugueses, africanos, indígenas, italianos, espanhóis e alemães), que acreditamos refletir, em parte, a própria população brasileira.

Em princípio, a idade em estudos genéticos não teria influência na suscetibilidade. Porém, em virtude da presença de alelos HLA-DRB1 com EC+ entre 12,5% e 35%^{23,38} da população sadia e da incidência maior da AR entre 30 e 55 anos,² tentamos evitar viés de análise quanto ao diagnóstico no grupo-controle. Por isso, decidimos incluir em nosso grupo-controle indivíduos com idade mais avançada.

Com relação à associação do HLA-DRB1 com a doença, observamos frequência aumentada dos alelos HLA-DRB1*04:01, *04:04 e *04:05 e associação positiva com a suscetibilidade à AR. Este resultado está, em parte, de acordo com os observados por Louzada-Junior *et al.*²³ na população brasileira predominantemente caucasiana, na qual, além da associação aos alelos citados anteriormente, também foi encontrada associação ao

alelo HLA-DRB1*01:01. Por outro lado, difere da observada por Bertolo *et al.*,²² que também analisaram populações de origem caucasiana e observaram associação significativa somente com alelos HLA-DRB1*01 (OR = 2,8).

Assim como observado por Louzada-Junior *et al.*,²³ o alelo HLA-DRB1*14:02 mostrou tendência de associação à AR, embora de forma não significativa (OR = 3,18; IC 95% 0,88-13,63; P = 0,086). É possível que estudos com maior número de indivíduos possam mostrar que essa associação seja estatisticamente significativa. Em um estudo com população mestiça peruana (n = 65) essa associação entre o alelo HLA-DRB1*14:02 e a AR foi observada (OR = 2,74).¹⁸

A presença dos alelos HLA-DRB1*09 em 6,7% dos pacientes com AR e 1,3% dos controles, predominante em descendentes de negros e indígenas, mostrou associação significativa nos genótipos heterozigotos desses alelos (OR = 5,19; IC 95% 1,50-21,49; P = 0,004). Não obstante o amplo intervalo de confiança observado, este alelo foi pela primeira vez associado à suscetibilidade à AR na população brasileira. Essa mesma associação (HLA-DRB1*09 e AR) também foi observada em pacientes chilenos com AR, em 1990.³⁹ Por outro lado, estudo realizado no Japão com 852 pacientes com AR encontrou associação com a doença apenas no genótipo HLA-DRB1*09:01 homozigoto.³⁶

Semelhante aos estudos de Vignal *et al.*³⁵ (OR = 5,04) e Balsa *et al.*³⁸ (OR = 1,8) incluindo população etnicamente homogênea, também encontramos associação do conjunto de alelos HLA-DRB1 EC+ com a AR (OR = 3,59). Este resultado é distinto ao descrito no estudo realizado por Teller *et al.*⁴⁰ incluindo pacientes com AR e controles hispano-americanos, no qual não foi observada associação desses alelos com a doença, o que sugere que a hipótese do EC provavelmente não poderia ser aplicada em estudos de população não miscigenada.

No presente estudo pode-se observar frequência aumentada de genótipos EC heterozigotos (51%) quando comparados aos pacientes com AR e controle com genótipos EC homozigotos (11%). Em estudo realizado por del Rincon *et al.*⁴¹ foram observados genótipos EC heterozigotos em 52% dos pacientes com AR, e EC homozigotos em 22%. Entretanto, Balsa *et al.*³⁸ encontraram que 29,8% dos pacientes eram heterozigotos e 14% eram homozigotos. Neste estudo, após análise de regressão logística dos genótipos homozigotos e heterozigotos HLA-DRB1 com EC+, observamos que pacientes que apresentam EC, independente de serem homozigotos (OR = 3,86) ou heterozigotos (OR = 3,54), apresentam risco aumentado, mas de magnitude semelhante (OR semelhantes) para o desenvolvimento da AR. Este resultado se contrapõe ao de del Rincon *et al.*,⁴¹ no qual a análise de 141 pacientes mexicanos com AR mostrou maior risco para genótipos EC

homozigotos (OR = 21,53) quando comparados com genótipos EC heterozigotos (OR = 1,84).

Com relação aos alelos HLA-DRB1 protetores para AR, observamos que alelos HLA-DRB1 codificadores da sequência de aminoácidos DERA A estão associados a menor risco de desenvolver AR (OR = 0,42), semelhante ao observado por Louzada-Junior *et al.*²³ em 2008 (OR = 0,49). Carrier *et al.*²⁵ avaliaram pacientes com poliartrite de início recente e observaram que os alelos DERA A não estavam associados à produção de autoanticorpos, bem como também mostrou-se efeito protetor para o desenvolvimento da AR (OR = 0,30). Mais recentemente, Balsa *et al.*³⁸ relataram que esses alelos conferem proteção para AR apenas com ACPA circulante (OR = 0,58). Outro estudo mostrou que alelos DERA A, além de conferir efeito protetor para AR, estariam associados à enfermidade menos grave.²⁴

Observamos maior frequência de FR (62%) e ACPA (71%) positivos quando comparados com grupo de pacientes brasileiros com AR inicial,⁴² cujas frequências eram em torno de 50%. Tal resultado pode ser justificado devido ao nosso grupo de pacientes apresentar maior tempo de doença (em torno de nove anos). Alelos HLA-DRB1 com EC foram relacionados com a positividade do FR e do ACPA, embora só a associação com a presença do ACPA tenha se mostrado significante (Tabela 6). Irigoyen *et al.*,²⁹ em 2005, observaram forte associação do ACPA a alelos EC, independentemente da presença do FR (OR = 5,8; IC 95% 4,1-8,3; P < 0,001 e OR = 3,1; IC 95% 1,8-5,3; P < 0,001). Semelhante ao observado por Balsa *et al.*,³⁸ este estudo mostrou que genótipos HLA-DRB1 EC homozigotos apresentaram níveis séricos do ACPA mais elevados quando comparados aos genótipos heterozigotos e aos dos pacientes sem o EC. Em contraste, os níveis séricos de FR não diferiram em pacientes com e sem alelos EC. Observamos que 88,8% de 27 pacientes com alelo HLA-DRB1*09 apresentaram ACPA e 85% apresentaram FR, sugerindo que outros mecanismos não EC estariam implicados no risco genético para o desenvolvimento de FR e ACPA.

Em síntese, este estudo, com amostra populacional predominantemente mestiça e mais representativa do povo brasileiro, evidenciou que os alelos HLA-DRB1*04:01, *04:04 e *04:05 associaram-se à suscetibilidade aumentada para AR, destacando-se também a associação ao alelo DRB1*09 nesses pacientes. Nossos resultados corroboram a associação entre alelos DRB1 EC e a suscetibilidade à AR e ao ACPA, previamente documentada em estudos com amostras populacionais geneticamente homogêneas. Além disso, mostramos que a presença do EC, quer em dose única ou dupla, comportou-se como fator de risco independente para a doença, bem como que a presença de

alelos DERA A apresentaram efeito protetor. Ademais, os alelos HLA-EC estiveram associados a maior positividade e maiores níveis séricos de ACPA. Embora as diretrizes para o diagnóstico da AR estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Reumatologia em 2011⁴³ recomendem que a pesquisa do HLA-EC não deva ser ainda um exame de rotina diária ao atendimento de pacientes com suspeita de AR, devido ao seu custo elevado, nosso estudo corrobora sua importância para o estabelecimento de fatores de risco e de proteção ao desenvolvimento da AR.

REFERENCES

REFERÊNCIAS

1. Senna ER, de Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol* 2004; 31(3):594-7.
2. Pinheiro GRC. Artrite reumatoide. In: Moreira C, Pinheiro GRC, Marques Neto JF (eds.). *Reumatologia Essencial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p. 338-54.
3. Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. *Rheumatology*. 4ed. Philadelphia: Mosby; 2008.
4. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):30-7.
5. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(4):399-402.
6. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30(11):1205-13.
7. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54(1):38-46.
8. Weyand CM XC, Goronzy JJ. Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992; 89(6):2033-9.
9. Weyand CM, Goronzy JJ. Inherited and noninherited risk factors in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7(3):206-13.
10. Massardo L, Gareca N, Cartes MA, Cervilla V, Gonzalez A, Jacobelli S. The presence of the HLA-DRB1 shared epitope correlates with erosive disease in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41(2):153-6.
11. Morgan AW, Haroon-Rashid L, Martin SG, Gooi HC, Worthington J, Thomson W *et al.* The shared epitope hypothesis in rheumatoid arthritis: evaluation of alternative classification criteria in a large UK Caucasian cohort. *Arthritis Rheum* 2008; 58(5):1275-83.
12. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Hajeer AH. Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2002; 31(6):355-60.
13. Lee HS, Lee KW, Song GG, Kim HA, Kim SY, Bae SC. Increased susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. *Arthritis Rheum* 2004; 50(11):3468-75.

