

**Wester Eidi Nishimura**

**ASSOCIAÇÃO DO HLA-B\*14 E HLA-Cw\*08 COM A  
SUSCETIBILIDADE PARA VASCULITE REUMATÓIDE  
(VR) E HLA-DRB5\*01 NA PROTEÇÃO PARA VR EM  
PACIENTES BRASILEIROS**

**Campinas  
2010**

**Wester Eidi Nishimura**

**ASSOCIAÇÃO DO HLA-B\*14 E HLA-Cw\*08 COM A  
SUSCETIBILIDADE PARA VASCULITE REUMATÓIDE  
(VR) E HLA-DRB5\*01 NA PROTEÇÃO PARA VR EM  
PACIENTES BRASILEIROS**

*Tese de Mestrado apresentada à pós-graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção de título de  
Mestre em Clínica Médica na área de Ciências  
Básicas.*

**Orientador: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo**

**Campinas**

**Universidade Estadual de Campinas**

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA**  
**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

N63a Nishimura, Wester Eidi  
Associação do HLA-B\*14 e HLA-Cw\*08 com a suscetibilidade para vasculite reumatóide (VR) e HLA-DRB5\*01 na proteção para VR em pacientes brasileiros / Wester Eidi Nishimura. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Manoel Barros Bértolo  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vasculite reumatóide. 2. Antígenos HLA. 3. Auto imunidade. 4. Suscetibilidade. I. Bértolo, Manoel Barros. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Association of HLA-B\*14 and HLA-Cw\*08 with susceptibility to rheumatoid vasculitis (RV) and HLA-DRB5\*01 with protection against RV in Brazilian patients**

**Keywords:** • Rheumatoid vasculitis  
• Antigen hla  
• Autoimmunity  
• Susceptibility

**Titulação: Mestre em Clínica Médica**  
**Área de concentração: Ciências Básicas**

*Banca examinadora:*

*Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo*

*Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra*

*Prof. Dr. José Roberto Provenza*

*Data da defesa: 31-08-2010*

---

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

Wester Eidi Nishimura

---

---

Orientador: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

---

---

**Membros:**

---

1. Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

2. Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

3. Prof. Dr. José Roberto Provenza

---

Handwritten signatures in blue ink are present over the list of members. The signatures appear to be: 1. A large, stylized signature, possibly 'Wester Nishimura'. 2. A signature that looks like 'Ibsen Bellini Coimbra'. 3. A signature that looks like 'José Roberto Provenza'. There is also a large, stylized signature below the list, possibly 'Manoel Barros Bértolo'.

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 31/08/2010

---

***Dedicatória:***

*Dedico este estudo à minha família e às pessoas que depositaram confiança no meu potencial como visionário do bem estar da humanidade.*

## ***Agradecimentos:***

*Agradeço ao Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo pela liberdade de atuação ponderada por sua exímia orientação.*

*Agradeço à saudosa Profa. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes pelo exemplo de vida e amor à arte de ser médico.*

*Agradeço à Profa. Dra. Lilian Tereza Lavras Costallat pelo estímulo frente às intempéries da conclusão desta tese.*

*Agradeço à Dra. Roseneide Aparecida Conde pelo apoio no manejo laboratorial deste estudo.*

*Agradeço a todos os pacientes submetidos a este estudo pela disposição em colaborar para a melhoria do saber médico.*

*“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.”*

*Mahatma Gandhi*



3.4.2 Classe II.....	29
3.4.2.1 Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers” para HLA-DRB1.....	29
3.4.2.2 Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers para HLA-DQB1.....	30
3.4.2.3 Detecção dos produtos amplificados pela PCR classe II.....	31
3.4.2.4 Análise dos resultados.....	31
3.5 Determinação do anti-CCP.....	32
3.5.1 Quantificação dos autoanticorpos.....	32
3.5.2 Lavagem.....	32
3.5.3 Controle de qualidade.....	33
3.5.4 Cálculo de resultados.....	34
3.6 Métodos estatísticos.....	34
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 Comparação em relação ao sexo, idade, raça, tempo de AR e DAS 28 nos pacientes com AR.....	35
4.2 Frequência em relação ao FR e anti-CCP nos pacientes com AR.....	37
4.3 Análise comparativa entre controles com AR e sem VR versus AR e com VR..	37
4.4 Atividade do DAS 28 e os alelos classe I e II no grupo total de AR.....	38
4.5 Correlação do DAS 28 com o tempo da doença versus HLA em pacientes com AR e com VR.....	40
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Saint Peter e Saint John healing a Cripple.....	2
<b>Figura 2.</b> Necroses digitais em pacientes com VR.....	15

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Critérios do American College of Rheumatology (ACR) – 1987.....	6
<b>Tabela 2.</b> Vasculite reumatóide: Critérios de Scott e Bacon – 1984.....	17
<b>Tabela 3.</b> Artrite reumatóide: Principais trabalhos estudando a correlação do HLA com vasculite reumatóide.....	26
<b>Tabela 4.</b> Comparação dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais no grupo total (N=57).....	36
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos alelos classe I e II em pacientes com AR sem VR e pacientes AR com VR.....	38
<b>Tabela 6.</b> Média do DAS 28 e frequência (%) dos alelos no grupo total (N=57).....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Freqüência quanto ao FR e anti-CCP nos pacientes com AR.....37

## LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Artrite reumatóide
E.U.A.	Estados Unidos da América
FR	Fator reumatóide
HLA	Antígeno leucocitário humano
ACR	American College of Rheumatology
Anti-CCP	Peptídeo citrulinado cíclico
VR	Vasculite reumatóide
DMARDs	Drogas modificadoras do curso da doença
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1	Interleucina um
KIRs	Receptores para imunoglobulinas de células “killer”
p-ANCA	Anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos perinucleares
VHS	Velocidade de hemossedimentação
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
INF- $\gamma$	Interferon gama
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônia
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de amônia
PCR-SSP	Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers”
dCTP	Citidina trifosfato
dGTP	Guanosina trifosfato

dATP	Adenosina trifosfato
dTTP	Timidina trifosfato
pb	Pares de base
DAS 28	Disease activity score

**RESUMO**

ASSOCIAÇÃO DO HLA-B\*14 E HLA-Cw\*08 COM A SUSCETIBILIDADE PARA  
VASCULITE REUMATÓIDE (VR) E HLA-DRB5\*01 NA PROTEÇÃO PARA VR  
EM PACIENTES BRASILEIROS

O objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência e a associação clínica do HLA classe I e II em pacientes brasileiros com vasculite reumatóide (VR). Nós avaliamos 57 pacientes com artrite reumatóide (AR) estabelecida pelos critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) - 1987. Dezesete apresentavam VR de acordo com os critérios de Scott e Bacon - 1984. Foram avaliados nestes pacientes dados demográficos, fator reumatóide (FR), anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), tempo de diagnóstico da AR e a atividade da doença pelo escore de atividade da doença (DAS 28). Os alelos HLA foram tipados usando a reação em cadeia da polimerase hibridizado com seqüências específicas de “primers” de baixa resolução. Quanto à atividade da doença nos pacientes sem VR observou-se frequência aumentada do HLA-B\*15 ( $p=0.033$ ) e HLA-DRB1\*01 ( $p=0.014$ ) com média de DAS 28  $3.2 \leq 5.1$  e o HLA-Cw\*16 ( $p=0.027$ ) e HLA-B\*07 ( $p=0.027$ ) com média de DAS 28  $>5.1$ . Não houve significância estatística de qualquer classe do HLA com o DAS 28 nos pacientes com VR. A comparação entre os 2 grupos mostrou diferença estatística ( $p=0.001$ ) para o DAS 28 com rank médio = 39.94 para os pacientes com VR. O HLA-DQB1\*05 ( $p=0.035$ ) esteve presente em 5 pacientes com VR com média de tempo de diagnóstico de AR de 17 anos e ausente em 12 pacientes com VR com média de tempo de diagnóstico AR de 11.45 anos. Os pacientes com VR tiveram frequência aumentada do HLA-B\*14 ( $p=0.006$ ) e HLA-Cw\*08 ( $p=0.006$ ). Uma frequência aumentada do HLA-DRB5\*01 ( $p=0.048$ ) foi encontrada em pacientes sem VR. Nossos resultados mostram na amostra estudada que a VR está associada ao sexo feminino, raça branca,

FR e anti-CCP positivos. O HLA-B\*15 e HLA-DRB1\*01 podem estar envolvidos na atividade moderada da AR sem VR e o HLA-Cw\*16 e HLA-B\*07 podem estar envolvidos na atividade intensa da AR sem VR. Não houve diferença estatística das classes do HLA com o DAS 28 para VR, porém a doença foi mais ativa em pacientes com VR quando comparados com pacientes sem VR. O HLA-DQB1\*05 pode estar envolvido nos casos tardios de AR para a manifestação da VR. O HLA-B\*14 e HLA-Cw\*08 podem estar envolvidos na suscetibilidade para VR. O HLA-DRB5\*01 pode conferir proteção contra esta manifestação extra-articular da AR.

**ABSTRACT**

ASSOCIATION OF HLA-B\*14 AND HLA-Cw\*08 WITH SUSCEPTIBILITY TO  
RHEUMATOID VASCULITIS (RV) AND HLA-DRB5\*01 WITH PROTECTION  
AGAINST RV IN BRAZILIAN PATIENTS

Our purpose was to evaluate the frequency and clinical association of HLA class I and class II in Brazilian patients with rheumatoid vasculitis (RV). We evaluated 57 patients with rheumatoid arthritis (RA) (American College of Rheumatology –ACR, 1987 criteria). Seventeen had RV according to Scott and Bacon’s criteria - 1984. Demographic data, time of RA diagnosis, disease activity by the Disease Activity Score (DAS 28), rheumatoid factor (RF) and cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) were analyzed. HLA alleles were typed using polymerase chain reaction-amplified DNA hybridized with low-resolution sequence-specific primers. HLA-B\*15 ( $p=0.033$ ) and HLA-DRB1\*01 ( $p=0.014$ ) were associated with moderate activity of RA without RV, and HLA-B\*07 ( $p=0.027$ ) and HLA-Cw\*16 ( $p=0.027$ ) with intense activity of RA without RV; no statistical significance of HLA class and DAS 28 was observed in RV. HLA-DQB1\*05 ( $p=0.035$ ) was related to RV in patients with late RA. The comparison between the groups showed an increased frequency of HLA-B\*14 ( $p = 0.006$ ) and HLA-Cw\*08 ( $p = 0.006$ ) in patients with RV, and an increased frequency of HLA-DRB5\*01 ( $p = 0.048$ ) in patients without RV. In conclusion, the HLA-B\*14 and HLA-Cw\*08 may be involved in susceptibility to RV and HLA-DRB5\*01 may confer protection against this extraarticular manifestation of RA.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Artrite reumatóide

### 1.1.1 Histórico

O histórico do interesse pela artrite reumatóide (AR) não é meramente banal, mas importante para o entendimento de como ela vem se comportando ao longo dos tempos. Alguns autores sustentam a teoria de que a doença é relativamente nova e que foi originada na América arcaica se baseando na explicação de que a doença tem um envolvimento genético importante e que fatores ambientais seriam os responsáveis pelo seu desenvolvimento e sua distribuição ao redor do mundo; mas ainda há controvérsias sobre tal teoria. Diversas tentativas têm sido aventadas para estabelecer a quanto tempo existe a AR, observando-se literatura médica e não médica, artes visuais e achados paleopatológicos (1).

Na literatura médica destacam-se o *Caraka Samhita*, texto médico escrito entre 500 a.C. e 100 d.C que incluía a descrição de uma poliartrite crônica e simétrica que causava nódulos, contratura e atrofia de dedos. *Scribonius Largus* descreveu em Roma cerca de 100 d.C a presença de poliartrite em mulheres entre 30 e 40 anos. *Michael Psellus* descreveu em *Chronographia* a condição do imperador romano Monomachus Constantine IX (980-1055d.C.) : uma poliartrite inflamatória recorrente e grave. *Alonso López de Hinojosos*, espanhol em 1578 descreveu um tipo de gota que era crônica sempre afetando algumas articulações causando deformidades e contraturas incapacitantes. *Sydenham* em 1676, mencionou uma doença das articulações caracterizada por cronicidade e deformidades. *William Heberden de Elder* (1710-1801 d.C) também descreveu uma doença crônica com poliartrite deformante distinguível da gota. E em 1782, *Jon Pétursson*, descreveu uma poliartrite crônica, simétrica e destrutiva que afetava predominantemente mulheres com idade em torno de 40 anos (1).

Com relação à pintura observam-se em quadros holandeses datados entre 1400 a 1700 evidências desta doença; como se observa na pintura de um autor holandês desconhecido intitulada de *The Temptation of St Anthony* aparentemente da primeira década do século XVI. Uma pequena gravura de *Albrecht Dürer* datada de 1513 intitulada *Saint Peter e Saint John healing a Cripple*, demonstra claramente que a figura do aleijado tem poliartrite simétrica associada com deformidades (Figura 1). *Jacob Jordaens*, falecido em 1678, pintou sua família incluindo o empregado demonstrando inchaço simétrico de articulações metacarpofalângicas e interfalângicas proximais o que sugere tratar-se de AR. E por fim outra obra de autor desconhecido de 1538, *Portrait of Siebrandus Sixtius*, demonstra consistentes deformidades das mãos sugerindo AR (1).



**FIGURA 1** - *Saint Peter e Saint John healing a Cripple* (1).

Nos achados paleopatológicos há um destaque de uma mulher que viveu na Inglaterra entre 70 - 470 d.C. que apresentava erosões dos ossos do carpo e dos metacarpos. Em três casos oriundos do cemitério francês do século 7-9 e outro do século 15 foram observadas erosões ósseas semelhantes. Um caso de uma mulher do Sudão (700-1500 d.C.) apresentava artrite erosiva com distribuição típica da AR. *Rothschild et al.* demonstraram em mais de 900 esqueletos de índios americanos arcaicos (6500-450 a.C.) poliartrite erosiva e simétrica de pequenas e grandes articulações. *Fraga et al.* descreveram em 21 esqueletos do *National Museum of Anthropology* no México, presença de poliartrite erosiva similar à AR moderna em mãos e pés datando de 1400 a.C. a 1550 d. C. (1).

Rothschild et al. (2), além de demonstrarem os achados patológicos de AR em esqueletos do Novo Mundo ( América do Norte ) fizeram uma comparação entre as regiões destes achados; mais precisamente em indígenas da região do Rio Verde centro-oeste de Kentucky e região oeste-central do Rio Tennessee em contraste com o Velho Mundo (Região mediterrânea) em épocas aproximadas e não observaram achados patológicos de AR nos esqueletos do Velho Mundo, sugerindo que a doença teria sua origem no Novo Mundo e aventando provável desenvolvimento da doença por um vetor (microorganismo ou alérgeno).

### 1.1.2 Conceito

A AR é definida como uma doença autoimune, crônica, sistêmica e inflamatória que causa poliartrite simétrica de grandes e pequenas articulações, mais freqüente entre a idade de 30 e 50 anos (3). Afeta cerca de 2 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América (E.U.A). Acomete inicialmente a membrana sinovial, evoluindo gradativamente com erosões ósseas e conseqüente destruição articular. Outras estruturas extra-articulares também são afetadas pelo processo inflamatório, tais como, tendões e músculos, com subseqüente limitação funcional e incapacidade física (4) . Em cerca de 5 % dos casos de AR há o desenvolvimento de manifestações extra-articulares sendo pele, olhos, pulmões e vasos sanguíneos as localizações mais freqüentemente envolvidas (5).

As áreas particularmente mais afetadas são as articulações de mãos e pés e muitos pacientes referem rigidez matinal de mais de uma hora. Aproximadamente 80% dos pacientes apresentam o fator reumatóide (FR) positivo e apenas 20% apresentam nódulos reumatóides (6).

Sobre incidência da doença, alguns estudos feitos em países nórdicos e nos E.U.A. demonstram uma incidência em homens de 0,15 a 0,26 por 1000 habitantes e de mulheres de 0,24 a 0,60 por 1000 habitantes (7). Há uma estimativa de 25 homens e 54 mulheres com AR por 100 mil habitantes em números absolutos ,sendo responsável por 250 mil hospitalizações nos E.U.A. todos os anos (3).

A variação geográfica da AR apresenta estimativas de 0,5 a 1% em estudos na Europa, América do Norte, Ásia e África do Sul, porém há grande prevalência da doença em índios norte-americanos das tribos pima, yakima e chippewa. É rara a sua presença em populações negras rurais africanas e na população chinesa. (7)

Segundo MacGregor e Silman apud Stastny P (8) a correlação com o antígeno de histocompatibilidade humano (HLA) nas formas graves da AR está evidente em pacientes

que apresentam a expressão do HLA-DR4, hoje melhor identificado por técnicas mais sensíveis de amplificação por PCR tendo sido possível identificar o epítipo compartilhado da molécula HLA-DRB1. A variação genética na região HLA pode explicar somente 30-50% da suscetibilidade em se desenvolver a doença, porém sua correlação está mais associada às formas graves da doença, assim como à presença do FR.

### 1.1.3 Classificação

A AR é classificada de acordo com os critérios de 1987 do *American College of Rheumatology* (ACR) (9) (Tabela 1) que têm uma sensibilidade em torno de 77-95% e especificidade em torno de 85-98% (7).

**TABELA 1**

**Crítérios do *American College of Rheumatology* (ACR) - 1987**

Rigidez matinal	Deverá ter duração mínima de 60 minutos até a melhora máxima
Artrite de três ou mais áreas articulares	Pelo menos três articulações diferentes acometidas simultaneamente com edema ou derrame vistos pelo médico
Artrite de articulações das mãos	Pelo menos uma articulação edemaciada em punhos, metacarpofalangianas (MCFs) ou interfalangianas proximais (IFPs)
Artrite simétrica	Envolvimento bilateral simultâneo (acometimento das articulações IFPs, MCFs e metatarsofalangianas é aceitável sem simetria absoluta)
Nódulos reumatóides	Nódulos subcutâneos sobre proeminências ósseas ou superfícies extensoras, ou em regiões justa-articulares observados pelo médico
Fator reumatóide	Demonstração do fator reumatóide por qualquer método que seja positivo em menos de 5% dos controles normais
Alterações radiográficas	Alterações típicas vistas em pósterio-anterior de mãos e punhos que incluem: osteopenia periarticular e erosões ósseas.

Para o diagnóstico de AR o paciente deverá apresentar pelo menos 4 destes 7 critérios. Os critérios de 1 a 4 devem estar presentes por um período mínimo de 6 semanas, sendo que pacientes com dois diagnósticos clínicos não são excluídos. ([www.rheumatology.org](http://www.rheumatology.org))

#### **1.1.4 Diagnóstico**

O diagnóstico é primariamente clínico e radiológico. A apresentação poliarticular simétrica com dor, rigidez matinal e edema de articulações é o quadro típico da doença. (3). Não há um achado do exame físico isolado ou um teste laboratorial único que seja patognomônico da doença (3,6). O diagnóstico precoce é essencial para que se possa iniciar o tratamento adequado evitando o dano articular. O tratamento deve ser instituído uma vez que os sintomas da doença estejam presentes pelo menos por 3 meses (6).

Uma minoria dos casos apresenta quadro oligoarticular e envolvimento assimétrico. O início é usualmente insidioso com sintomas articulares emergindo em semanas ou meses e podendo estar acompanhado de anorexia, fraqueza ou fadiga (3). Não há ainda critérios classificatórios para AR precoce muito menos um consenso quanto ao diagnóstico, porém é necessário uma intervenção oportuna diante dos sintomas que sugiram AR mediante a exclusão de outras doenças tentando evitar danos futuros da doença. (6).

Ao exame físico as articulações mais acometidas são as interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas e metatarsofalangeanas com presença de edema, tendinodinia e atrofia da musculatura interóssea. Eventualmente os pacientes podem apresentar sintomas sistêmicos como febre, perda de peso, linfadenopatia e envolvimento de múltiplos órgãos (3).

Artrites reativas, espondiloartropatias soronegativas e outras doenças do tecido conjuntivo fazem parte do diagnóstico diferencial da AR, assim como endocrinopatias, neoplasias e infecções (3).

Exames subsidiários por imagem como radiografias, ultrassonografia e ressonância magnética podem revelar erosões e sinovites (6). No diagnóstico laboratorial deve ser incluído hemograma com contagem diferencial de células que pode revelar leucocitose por vezes associada à linfopenia relativa; fator reumatóide que pode estar positivo em torno de 80% dos pacientes; velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa como provas de

atividade inflamatória estando por vezes aumentadas. (3). A detecção do anticorpo para proteínas citrulinadas cíclicas (anti-CCP) tem sido um elemento auxiliar a mais no diagnóstico precoce da AR, pois tem alta especificidade e valor preditivo positivo, mas está presente em menos de 60% dos pacientes com AR tendo seu valor como diagnóstico diferencial em outras doenças que também cursam com poliartrite (3). A combinação com anti-CCP e FR positivos aumenta a especificidade para o diagnóstico da AR (6). Estudo recente feito em uma população brasileira miscigenada estabeleceu também uma correlação estatisticamente significativa da associação do anti-CCP com o epítipo compartilhado HLA-DRB1 em pacientes com AR, sendo o anti-CCP mais freqüente em pacientes que apresentavam o epítipo compartilhado positivo (10).

## **1.2 Vasculite reumatóide**

### **1.2.1 Conceito**

A vasculite reumatóide (VR) é uma das manifestações clínicas da AR sendo mais comum naqueles com FR positivo (11). O envolvimento inflamatório vascular provavelmente faz parte da patogênese da AR, constatado através da presença de infiltrado de células mononucleares em capilares e vênulas da membrana sinovial em achados histológicos de biópsias e necrópsias de doentes (12).

Na maioria das vezes a VR é assintomática, mas ocasionalmente pode ser grave, afetando qualquer território vascular (5,12). Afeta principalmente artérias de pequeno e médio calibres e está associada com alta taxa de mortalidade, aproximadamente 40% dos casos em 5 anos, com significativa morbidade devido ao dano ao órgão acometido pela vasculite (13). O nódulo reumatóide é a principal manifestação extra-articular da AR sendo uma vasculite de pequenos vasos (11).

Histologicamente a vasculite necrosante é definida pela presença de necrose fibrinóide na parede vascular, acompanhada por infiltrado de células inflamatórias transmural e presença de neutrófilos polimorfonucleares com fragmentação nuclear (leucocitoclasia). A lesão da camada endotelial predispõe à trombose e consequente isquemia no território correspondente.. A necrose da parede vascular poderá causar a ruptura do mesmo, ocasionando o aparecimento de petéquias ou púrpuras (5,14).

Os vasos da pele são os mais freqüentemente envolvidos em cerca de 90% e a “vasa nervorum” dos nervos periféricos em torno de 40%. A manifestação mais comum na pele é a isquemia focal digital, seguida de petéquias, púrpuras e/ou úlceras. Já o pioderma gangrenoso é o acometimento cutâneo mais raro na VR. Em relação aos nervos periféricos a manifestação clínica mais comum é a mononeurite múltipla seguida de neuropatia sensorial periférica (5).

## 1.2.2 Epidemiologia da VR

A frequência de VR é difícil de ser estabelecida, visto que há poucos estudos com dados clínicos específicos e também pela freqüente utilização de drogas para o controle de atividade de doença, causa freqüente de vasculite secundária, diminuindo assim sua ocorrência. Estudos prévios apontam freqüência variável de VR dependendo do estudo realizado, se por dados necroscópicos ou somente clínico. Um estudo com achados necroscópicos relata freqüência da VR variável de 15 a 31%: na Hungria a freqüência de VR é apontada como sendo 15%, nos EUA (The Mayo Clinic) 23% e no Japão 31% (5). Um estudo japonês revelou a presença de vasculite ativa e inativa em necrópsias de 81 pacientes com AR; destes somente 5 apresentavam vasculite ativa definida como degeneração fibrinóide e infiltração das paredes de pequenas artérias e arteríolas por células inflamatórias sendo esta uma das mais detalhadas descrições de VR (15). Segundo Genta et al (16), um estudo realizado na Clínica Mayo nos E.U.A. demonstrou que somente 4 de 52 pacientes com AR necropsiados tinham inflamação de artérias e arteríolas de pequeno e médio calibre, bem como envolvimento focal de grandes artérias, capilares e veias.

Já a frequência de VR é menor quando o diagnóstico é baseado em elementos clínicos e não necroscópicos. Em um estudo do norte da Itália, 141 pacientes com AR foram acompanhados durante 2 anos e somente 3 (2,1%) desenvolveram VR (17). Em outro estudo belga 2 grupos (91 pacientes com AR em uso de metotrexate e 130 usando outras drogas) foram avaliados por 18 meses e uma freqüência idêntica (5,4%) de VR foi encontrada nos 2 grupos (18). Segundo Genta et al (19), uma análise retrospectiva de prontuários de 4000 pacientes com AR em Paris revelou uma freqüência menor que 1% de VR em 10 anos.

Dados mais recentes ainda sugerem que houve diminuição da freqüência da VR. Na Inglaterra um estudo retrospectivo (1988-2002) demonstrou que a incidência de VR em pacientes com AR diminuiu de 11,6 para 3,6 / milhão nos primeiros e últimos 5 anos

respectivamente (21). Outro estudo, conduzido na Califórnia, sustenta ainda que houve também queda da incidência da VR como causa de hospitalizações, de 170/100 mil em 1983 para 99/100 mil em 2001 (22). Porém, outro estudo já não evidenciou redução da frequência de manifestações extra-articulares da AR, incluindo a VR, expandindo a análise até 2004, indicando que os 10 anos de incidência cumulativa para VR grave ( vasculite cutânea maior e/ou neuropatia) permaneceu estável nas últimas 4 décadas (1955-1994) (20). Estes resultados discrepantes devem-se principalmente às diferenças das populações estudadas e dos métodos utilizados na investigação (5).

A taxa de mortalidade por AR é cerca de 2 vezes maior que aquela relatada para a população geral e está correlacionada, por vezes, à gravidade da doença. Há evidências que a VR pode contribuir para o aumento da taxa de mortalidade em pacientes com AR. Um estudo comparou a taxa de mortalidade em uma série de 61 pacientes com VR e 244 com AR sem VR, durante um período de 12 anos de seguimento. Os autores observaram maior mortalidade no grupo de pacientes com VR quando comparado ao grupo sem VR, 44% e 27% respectivamente, sendo que a principal causa de óbitos nos pacientes com VR foi infecção (21). Já em outras casuísticas a frequência de óbito por VR é apontada como variável de 30 a 33% (5).

Ward (22) estudou o declínio de internações hospitalares em decorrência de manifestações graves da AR de 1983-2001 no estado da Califórnia nos Estados Unidos através da análise do banco de dados de internações daquele estado e concluiu que houve um declínio progressivo da VR, ou seja, o risco de hospitalização de VR foi 31 vezes menor entre 1998-2001 do que 1983-1987 devido possivelmente ao uso de drogas modificadoras do curso da doença (DMARDS).

Ao contrário do observado na AR, a VR é mais prevalente no sexo masculino e não há dados disponíveis a respeito de raça e etnia (5,13). Segundo Turesson e Matteson (13), a VR

se desenvolve em pacientes com AR de longo tempo de evolução, geralmente com mais de 10 anos e raramente na fase inicial de doença. (11).

Preditores de VR incluem fatores clínicos e genéticos. Segundo Silman et al (23), em um estudo caso-controle feito em gêmeos com AR e que fumavam e gêmeos sem AR e que fumavam (n=79 monozigóticos e n=71 dizigóticos) concluiu que o hábito de fumar é um fator de risco para o desenvolvimento de AR na população geral e associado ao aumento do risco de VR nos pacientes com AR (24). Os fumantes com AR tem mais chances de formar nódulos reumatóides e estes são preditores da ocorrência de VR (25,26). A interação entre fumar e os alelos HLA-DRB1 são fatores de risco para a AR e fumar tem efeito imunomodulatório com impacto particular na VR, apesar de ser preditor independente para a VR e outros tipos de AR grave extra-articular (24). A exposição a agentes infecciosos também parece estar relacionada ao desenvolvimento da VR como um raro caso de vacinação para influenza descrito por Iyngkaran et al (27), relatando uma paciente do sexo feminino fumante com história de AR com FR positivo que desenvolveu vasculite de artelhos de mãos e pés após duas semanas da vacinação para influenza inclusive com reativação do quadro articular. Contudo não há estudos prospectivos suficientes para contraindicar o uso da vacinação para o influenza em pacientes com doenças reumatológicas, sendo sem dúvida o benefício maior do que o risco nos poucos estudos existentes.

### **1.2.3 Fisiopatologia da VR**

A patogênese da VR ainda não está muito bem estabelecida, mas é senso comum que o mecanismo envolvendo imunocomplexos seja o de maior relevância. A presença de altos títulos de fator reumatóide também podem estar associada à patogênese da doença, bem como os níveis aumentados de anticorpos anti-células endoteliais, anticorpos anti C1q e anticorpos glicose-6-fosfato isômeros. A deposição de imunocomplexos pode induzir reação

inflamatória e ativação da cascata de complemento, bem como a expressão de receptores Fc na superfície das células. O papel dos receptores Fc leucocitários na patogênese da vasculite mediada por imunocomplexos tem sido demonstrado em modelos experimentais através da indução da degranulação, fagocitose, expressão de moléculas de adesão e da liberação de citocinas, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6); estas citocinas estimulam quimiocinas e moléculas de adesão, IL-1 e TNF- $\alpha$  têm um efeito procoagulante e induz a produção de metaloproteinases que levam a oclusão e lesão da parede vascular.(5,14)

A ativação endotelial sistêmica com expressão do HLA classe II, IL-1 e TNF- $\alpha$  em células endoteliais e a expansão de células T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> têm sido implicadas na patogênese da VR. O aumento da expressão do HLA-DQ e IL-1 pode indicar ativação endotelial sistêmica naqueles pacientes com AR e manifestação extra-articular e pode ser um fator indicador de comorbidade e mortalidade nestes pacientes (28).

Martens et al, (29) fizeram um estudo longitudinal com 108 pacientes com AR e 53 controles normais para expansão de células T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> e encontraram uma distribuição bimodal na frequência de células T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>. Os autores observaram correlação da expansão destas células com envolvimento extra-articular, principalmente em pacientes que tinham nódulos reumatóides e doença orgânica sistêmica; porém não demonstraram sinal de dependência do polimorfismo do HLA-DR com o “status” da presença de células T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>. Michel et al (30), também demonstraram a importância da expressão de células T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> na gênese da AR, particularmente nas formas graves da doença, com um estudo caso-controle envolvendo 72 pacientes com AR e 53 controles normais pareados para sexo e idade; o grupo de pacientes com AR ainda foi dividido em doença extra-articular (incluindo VR) e doença limitada às articulações; nos pacientes com doença extra-articular foi maior a frequência de células T CD56<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> do que naqueles com doença articular.

A baixa expressão de CD28 e o acúmulo de CD56 sugere que este último contribua para o processo mal-adaptativo imune. O dano vascular na AR se deve à expansão de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> que expressam receptores para imunoglobulinas de células “killer” (KIRs); há um estímulo do gene KIR2DS2 na ausência de receptores inibitórios se opondo ao processo; a conjugação KIR2DS2 com o ligante HLA-C apropriado pode ter papel no dano vascular por regulação de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (24,31).

#### **1.2.4 Quadro clínico da VR**

Como já foi dito, a VR pode envolver artérias de qualquer calibre, porém, capilares, arteríolas e vênulas são os mais comumente afetados e as manifestações clínicas são decorrentes do processo inflamatório que ocasiona lesões destrutivas das paredes destes vasos. Histologicamente, vasculite necrosante é definida pela presença de necrose fibrinóide na parede vascular, acompanhada por infiltrado transmural de células inflamatórias e presença de neutrófilos polimorfonucleares com fragmentação nuclear (leucocitoclasia). A necrose da parede vascular poderá causar a ruptura do mesmo, ocasionando o aparecimento de petéquias ou púrpuras (5,14). As mais graves características da VR são os infartos digitais francos (Figura 2) e mononeurite múltipla (11).



**FIGURA 2** – Necroses digitais em paciente com VR (11).

A VR é mais comumente observada em pacientes com mais de 10 anos de doença, porém é descrita em qualquer período de evolução e quase sempre está correlacionada a um pior prognóstico (13). Pacientes com AR grave, doença destrutiva articular e outras manifestações extra-articulares são os mais freqüentemente acometidos por VR. A artrite em atividade nem sempre está presente por ocasião do aparecimento da VR (13). A VR pode acometer qualquer vaso sanguíneo, principalmente do leito arterial incluindo artérias cerebrais, mesentéricas e coronárias (33).

A vasculite nestes pacientes afeta freqüentemente mais do que um simples órgão. Os pacientes poderão desenvolver infartos das pontas dos dedos e úlceras em membros inferiores. Estas lesões freqüentemente estão associadas a um trauma, porém a sua extensão e sua cronicidade estão relacionadas à insuficiência arterial, trauma contínuo, edema, uso crônico de glicocorticóide e tabagismo (13).

O tipo de acometimento de nervo periférico mais comum em pacientes com VR é a mononeurite múltipla, às vezes subclínica com predomínio axonal; entretanto, muitos casos

de neuropatia periférica em pacientes com AR não são devidos à vasculite e sim à outras condições como compressão local nervosa e diabetes. O estudo prospectivo de Agarwal et al (34), estudando 108 pacientes com AR demonstrou alguma evidência de neuropatia pela clínica ou eletroneuromiografia e a biópsia do nervo sural revelou, como forma predominante, o espessamento perineural seguido de depósito amilóide; também não houve neste estudo correlação com o tempo de história da AR e presença do FR. A mononeurite pode se iniciar com parestesias e depois evoluir com fraqueza progressiva muscular; um “rash” cutâneo na área envolvida também poderá estar presente. Inicialmente a mononeurite é assimétrica mas pode evoluir para simetria (13).

Outra manifestação clínica da VR inclui a serosite, principalmente a pericardite. Os nódulos reumatóides também são mais evidentes em pacientes com AR e vasculite (26). O acometimento de artérias coronárias é um evento mais raro, assim como artérias renais o que pode levar a insuficiência renal como o observado na poliarterite nodosa (13).

A glomerulonefrite também poderá ocorrer em pacientes com VR apresentando depósitos de imunocomplexos nas artérias e capilares e lesões em artérias de médio calibre e glomérulos. Os pacientes podem ter anticorpos antinucleares ou anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos perinucleares (p-ANCA) positivos. O p-ANCA é raro em pacientes com AR, principalmente se direcionado contra proteinase-3 e poderá estar associado à vasculite necrosante sistêmica primária (13).

### **1.2.5 Diagnóstico**

Scott e Bacon (35) elaboraram critérios para o diagnóstico da VR através de elementos clínicos e histopatológicos e incluem: 1) mononeurite múltipla, 2) gangrena periférica, 3) arterite aguda necrosante documentada por biópsia em pacientes com doença sistêmica (febre e emagrecimento) e 4) úlcera cutânea profunda ou doença extra-articular

ativa (pleurite, pericardite e esclerite) acompanhada de vasculite (evidência de outro infarto digital ou histopatologia) (Tabela 2). O diagnóstico de VR será definido se preencher um ou mais destes critérios, sendo que a presença de lesão isquêmica de pele (exceto por infarto digital isolado) ou mononeurite múltipla em pacientes com diagnóstico estabelecido de AR é o suficiente para presumir o diagnóstico de VR (5)

## TABELA 2

### VASCULITE REUMATÓIDE: CRITÉRIOS DE SCOTT E BACON - 1984

---

1. Mononeurite múltipla
2. Gangrena periférica
3. Achado histopatológico de arterite aguda necrosante em pacientes com doença sistêmica ( febre e emagrecimento)
4. Úlcera cutânea profunda ou doença extra-articular ativa (pleurisia, pericardite e esclerite) acompanhada de vasculite (evidência de outro infarto digital ou histopatologia)

---

O diagnóstico é estabelecido pelo preenchimento de 1 ou mais destes critérios.

Não há um teste laboratorial específico para o diagnóstico da VR, pois anemia, aumento de VHS e da proteína C reativa e títulos altos de fator reumatóide, observados na VR poderão também estar presentes em pacientes com AR sem VR (5,12).

Pacientes que tem altos títulos de FR, anti-CCP positivo, crioglobulinas e complemento baixo são mais propensos a desenvolver úlceras de membros inferiores e também digitais (26). A presença de anti-CCP positivo em pacientes com AR está associado à manifestações extra-articulares graves , segundo Turesson et al (36), que em um estudo caso controle de 35 pacientes com manifestações extra-articulares graves, incluindo a VR, comparados à 70 pacientes com AR sem gravidade detectou a presença de anti-CCP em 77%

dos pacientes com manifestações graves versus 56% dos sem estas manifestações. O valor diagnóstico do anti-CCP foi também avaliado por Laskari et al (37), em 93% de 25 pacientes com AR e com VR sistêmica que apresentaram o anti-CCP positivo, comparados com 70% de sua detecção em 19 pacientes com AR e sem VR . Os níveis séricos de anti-CCP também tendem a ser mais elevados em pacientes com AR e vasculite sistêmica do que naqueles que não apresentam evidência de vasculite (36).

### **1.2.6 Tratamento**

O tratamento da VR é em grande parte empírico. O que se observa em relatos de Turesson e Matteson (35,38) é que há uma tendência ao uso de ciclofosfamida e altas doses de glicocorticóide em pacientes com VR sistêmica e grave. De uma maneira geral, o uso de potentes drogas modificadoras do curso da doença é recomendado no caso de VR, havendo evidencias de benefícios com a utilização de agentes citotóxicos (40).

Sobre o uso de agentes biológicos, como os inibidores de fator de necrose tumoral (anti-TNF), no tratamento ou mesmo na indução da VR os resultados são um tanto confusos. Jarret et al (39), discutiram em seu estudo a possibilidade do anti – TNF ser responsável pela indução de vasculite em pacientes submetidos a este tratamento; concluíram que 8 pacientes com AR desenvolveram diversas manifestações clinicas de vasculite durante o tratamento com o anti-TNF. Contudo outros estudos, como o de Turesson et al (41), avaliando a redução do risco de manifestações extra-articulares da AR incluindo a VR em pacientes tratados com anti-TNF; concluíram que houve uma redução das manifestações extra-articulares graves na AR de 0,99 para 0,25/ 100 pessoas-ano e o de Puéchal et al (42), que observaram a efetividade do anti-TNF em pacientes com VR resistentes ao tratamento e observou a remissão em 6 de 9 pacientes após 6 meses de uso de anti-TNF, previamente refratários ao uso de ciclofosfamida e glicocorticóide.

O uso dos inibidores de células B, como o rituximabe, ficaria restrito a pacientes que não poderiam ser submetidos ao uso de agentes citotóxicos e anti-TNF, seja por falha de tratamento ou contra-indicação na utilização dos mesmos (13).

Como já descrito a VR poderá acometer vasos coronarianos, portanto, há um risco particular de doença cardiovascular em pacientes com AR e VR mesmo estando controlados os fatores de riscos tradicionais (tabagismo, hipertensão, diabetes e dislipidemia) como demonstrado em um estudo coorte prospectivo desenvolvido por Maradit-Kremers et al, (43). Dos 603 pacientes avaliados no período de 1955 a 1995, 354 pacientes foram a óbito e destes 176 por causa cardiovascular: a análise multivariada revelou alto risco de morte cardiovascular em pacientes com AR com VHS maior ou igual a 60mm/h e em pacientes com VR e doença pulmonar. Contudo, Turesson et al. (20), observaram em seu estudo em uma incidência cumulativa de 10 anos calculada para pacientes (n=609) agrupados por décadas (1955-64; 1965-74; 1975-84; 1985-94) uma presença maior de VR grave ( pele e nervos), fibrose pulmonar e Síndrome de Sjögren do que manifestações cardiovasculares (pericardite em 8 pacientes). Cabe ressaltar que com o advento do uso dos DMARDS a incidência de complicações severas da AR, incluindo a VR, diminuiu substancialmente (44). Em outro estudo, Turesson et al (45), avaliando pacientes com manifestações extra-articulares da AR (n=8) e pacientes sem tais manifestações (n=184) observaram o efeito destas para o risco de primeiro evento cardiovascular depois do diagnóstico da AR e encontraram associação significativa entre os mesmos, sendo as manifestações extra-articulares (pericardite, pleurite, Síndrome de Felty, polineuropatia, mononeuropatia, esclerite, episclerite, glomerulonefrite, vasculite cutânea ou vasculite de outros órgãos).

Portanto é importante monitorar estes pacientes para potenciais agravantes do risco cardiovascular como hipertensão arterial, tabagismo, diabete mellito, dislipidemia e obesidade (13). O estudo recente de van Halm et al (46), demonstra que a AR tem o mesmo

impacto de risco para doença cardiovascular como o diabetes tipo 2, sugerindo uma escala similar de prevenção para estes pacientes com AR como a usada no diabetes. O uso de anti-TNF associado à redução de risco cardiovascular em pacientes com AR também foi abordado por dois estudos, Jacobsson et al (47) e Dixon et al (48); este último um estudo prospectivo e observacional com pacientes submetidos à terapia com anti-TNF (n=8670) e DMARDS convencionais (n=2170) que tiveram infarto do miocárdio e a conclusão em 6 meses de estudo foi que o uso do anti-TNF não diminui a incidência de infarto quando comparado ao grupo de pacientes que usavam DMARDS convencionais; entretanto o risco de infarto foi menor naqueles que usaram anti-TNF, possivelmente por melhor controle da inflamação.

### **1.3 Complexo de histocompatibilidade principal (MHC)**

O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) tem como função ligar fragmentos peptídicos derivados de patógenos exibindo-os na superfície celular onde o complexo é reconhecido por células T. No homem o MHC se localiza no cromossomo 6, estendendo-se ao longo de 4 centimorgans de DNA, ou cerca de  $4 \times 10^6$  pares de bases, contendo mais de 200 genes. Os genes que codificam as cadeias  $\alpha$  das moléculas MHC de classe I e as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das moléculas MHC classe II situam-se dentro do complexo. No homem esses genes são chamados de *human leukocyte antigen* ou genes HLA, devido a sua descoberta ter sido feita através de diferenças entre leucócitos de diferentes indivíduos. Há 3 genes de cadeia  $\alpha$  de classe I no homem, chamados de HLA A, B e C. Existem também 3 pares de genes de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do MHC de classe II, chamados de HLA-DR-DP e HLA-DR-DQ. Os antígenos de classe I são expressos sobre a superfície de quase todas as células, enquanto os antígenos de classe II são encontrados predominantemente sobre a superfície de linfócitos B, macrófagos, e, após indução por interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), sobre outros tipos de

células, incluindo linfócitos T e células endoteliais. A função fisiológica das moléculas dos antígenos HLA classe I e II é a de apresentar peptídeos para os linfócitos T, levando a uma resposta imune através da liberação inicial de mediadores como IL1 e TNF por macrófagos. No caso específico da AR, estes mediadores podem atuar em conjunto ou mesmo individualmente.(32)

Para a maioria das doenças auto-imunes a suscetibilidade está mais intimamente ligada a alelos do MHC de classe II, mas em alguns casos há fortes associações com determinados alelos do MHC de classe I ( 32).

A associação entre o genótipo do MHC e doenças auto-imunes é inicialmente determinada comparando-se a frequência dos diferentes alelos em pacientes com a frequência desses na população. Outro modo de determinar se os genes MHC são importantes na doença auto-imune é estudar as famílias de pacientes afetados. Há evidências que dois irmãos afetados pela mesma doença auto-imune têm muito mais probabilidade do que o esperado de partilhar os mesmos haplótipos do MHC, porém o desenvolvimento da doença depende de outros fatores como o ambiente e genética própria.(32)

À medida que a genotipagem do HLA tornou-se mais detalhada devido ao sequenciamento de alelos de HLA, as associações às doenças, que foram inicialmente descobertas por sorotipagem utilizando anticorpos, passaram a ser definidas mais precisamente (32)

A associação dos genótipos do MHC com doenças auto-imunes não surpreende, pois as respostas imunomediadas envolvem as células T e a capacidade dessas em responder a um determinado antígeno depende do genótipo do MHC. Assim, as associações podem ser explicadas por um modelo simples em que a suscetibilidade a uma doença auto-imune é determinada por diferenças na capacidade de diferentes variantes alélicas de moléculas MHC em apresentar peptídeos auto-antigênicos às células T auto-reativas. Há evidências da

participação de fatores genéticos na etiologia da AR e o polimorfismo gênico está provavelmente envolvido nas variadas expressões da doença. O fenótipo com isso é muito heterogêneo dependendo da suscetibilidade dos alelos o que pode determinar uma doença de característica mais amena ou até mais agressiva expandindo seu acometimento além das articulações (manifestações extra-articulares), fonte base deste estudo.(49). Já está bem estabelecida uma associação do HLA-DR4 com suscetibilidade à AR com pior prognóstico e o objetivo deste estudo é observar como se comporta a frequência gênica de um determinado subtipo de HLA e com isso correlacionar a sua presença na vasculite reumatóide.

#### **1.4 Associação HLA e VR**

Sobre a associação da VR com o sistema HLA existem trabalhos que sugerem a associação principalmente com o HLA-DRB1\*04 (50,51). O efeito sobre o repertório de células T é notório e crucial na gênese da AR em especial na forma mais grave da doença com manifestações extra-articulares e estas estariam interagindo com o sistema HLA (24).

Diversos estudos tentam correlacionar a presença do HLA, principalmente os da classe II, com a VR como um subsídio a mais para explicar o seu surgimento, visto que o desenvolvimento de vasculite decorre de inúmeros fatores, desde a presença do fator reumatóide em altos títulos à deposição de imunocomplexos.

A presença de um determinado tipo de HLA se associando a VR por diversas vezes foi observado como o estudo elaborado por Turesson et al (49), que avaliaram o HLA-DRB1 e o HLADQB1 em pacientes com AR sem manifestações extra-articulares (n=178) e compararam com pacientes com AR e manifestações extra-articulares graves (n=159) e concluíram que o HLA-DRB1\*04 estava associado à VR.

Já outro trabalho de Turesson et al (24), compararam o tabagismo e o genótipo HLA-C em pacientes com VR (n=159) e pacientes sem outra manifestação extra-articular (n=178)

e concluíram que o HLA-C3 estava associado com VR e que o tabagismo é um preditor independente para VR ou outros tipos de manifestações extra-articulares graves. Watts et al (44) avaliaram 74 pacientes acometidos de VR no período 1988-2002 e concluíram que neste período houve uma redução do número de tabagistas na Inglaterra e isso poderia ser um fator que explicaria o declínio da frequência de VR nesse período, e, em contrapartida, o uso de corticosteróides oral seria um fator de risco para o desenvolvimento da VR.

A metanálise de Gorman et al. (51), evidenciou um total de 14 estudos relacionados à presença do HLA-DRB1 com VR. No total de 1568 pacientes dos estudos, 129 apresentaram VR e foi evidenciada susceptibilidade para o desenvolvimento da VR na presença dos genótipos HLA-DRB1\*0401/\*0401, \*0401/\*0404 e \*0101/\*0401.

Cunningham et al. (52), avaliaram um total de 114 pacientes com AR, sendo 30 com VR, e concluíram que havia uma frequência aumentada do HLA-DR4 em ambos os grupos de pacientes sendo que a presença do HLA-DR4 não permitiu distinguir pacientes com AR e os com VR; entretanto o HLA-DR3 estava aumentado em 18 dos 30 pacientes com VR o que poderia sugerir uma distinção entre os dois grupos. Cabe uma ressalva, porém, porque a técnica de tipificação do HLA usada na década de 80 e 90 era utilizando o DNA genômico pelo método de avaliação dos tamanhos dos fragmentos de DNA pela digestão com endonucleases de restrição. Nessa técnica o DNA extraído de células nucleadas é digerido com enzimas de restrição e os fragmentos separados em géis de agarose. O DNA é desnaturado e seus fragmentos hibridizados com sondas marcadas com isótopos radioativos de DNA complementar para o locus a ser estudado e o padrão de bandas obtidas define a especificidade, contudo o método é de baixa resolução e de execução demorada. O método mais atual de identificação de HLA é a amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e sondas ou iniciadores (primers) de oligonucleotídeos de seqüência específicos é o método mais acurado que o anterior (53). Concluí-se que a técnica utilizada

por Cunningham et al. em 1982 é menos eficiente que a utilizada por Gorman et al. em 2004 o que pode ter ocultado a evidência da correlação do HLA-DR4 com a VR.

Trabalhos analisando etnias, como o estudo de Salvarani et al. (17) e Gladman e Anhorn (54) também tentaram correlacionar a presença de determinado tipo de HLA com as manifestações da AR. O primeiro trabalho estudou 141 pacientes do norte da Itália e foi observada uma frequência de 2,1% de VR nesta população; o HLA-DR4 estava aumentado nos pacientes com AR, porém nenhuma menção foi feita sobre sua correlação com VR. O segundo estudo, porém, analisou uma amostra de pacientes canadenses com AR (n=48) e foram feitas tipagem para HLA classe I e classe II, sendo encontrada uma correlação positiva com o HLA-DR4 para manifestações extra-articulares (n=30) e para pacientes com VR (n=4).

Porém em outros como o trabalho de Bernelot et al. (55), que estudaram 120 pacientes com AR a presença de infiltração perivascular de pele em pacientes reumatóides não teve correlação significativa com o HLA-DR3 e DR4, correlacionando-se a inflamação perivascular à presença do fator reumatóide, assim como o trabalho de Hutchings et al (56), onde não se observou significância estatística de associação entre o HLA-DP com manifestações extra-articulares como a Síndrome de Felty e vasculite.

O trabalho de Seitz et al. (57), estudou um total de 83 pacientes com diagnóstico de AR e estes foram divididos em 03 grupos de acordo com os alelos HLA-DRB1 associados à AR; o grupo I (04/04-n=14 e 01/04-n=10), grupo II (04/X-n= 26; 01/X-n=11) e grupo III (X/X-n=22); onde X significa todos os doentes que não expressam doença associada aos alelos DRB1 e foi encontrada significância estatística entre AR e a presença do HLA-DRB1\*04 e do HLA-DRB1\*01, porém em relação às manifestações extra-articulares, como a VR, por exemplo, não se estabeleceu uma correlação positiva com o HLA-DRB1 seja qual fosse o alelo.

Voskuyl et al. (58), compararam através de caso-controle, a frequência do HLA-DRB1\*04, HLA-DQA1 e o HLA-DQB1 em 31 pacientes com AR e VR e 76 pacientes com AR sem VR e observaram que apenas para VR cutânea houve frequência aumentada em pacientes homocigotos para o HLA-DRB1\*04 e também para aqueles com HLA-DRB1\*0401 e para VR de outros órgãos nenhuma correlação foi evidenciada.

O estudo de Perdriger et al. (59), recrutou 189 pacientes com AR e os classificou de acordo com a presença de vasculite e positividade para o fator reumatóide (FR) e a presença do HLA-DRB1\*0401 foi observada em 71,5% dos 21 pacientes com vasculite e 57,6% dos 158 pacientes com FR positivo; o papel do HLA-DQ no desenvolvimento da VR não foi relevante, com pequena expressividade do HLA-DQ\*0301.

Já Tourissot et al. (60), avaliaram em pacientes franceses os efeitos dos alelos HLA-DRB1 na suscetibilidade à doença grave. Para o estudo foram selecionados 120 pacientes caucasóides com AR nascidos na França oriental e com mais de um ano de doença. Os pacientes foram avaliados para todas as manifestações clínicas possíveis para AR, incluindo a VR (úlceras cutâneas sem aterosclerose arterial, neuropatia periférica e mononeurite múltipla). Todos os pacientes haviam usado DMARDs. O estudo foi dividido em 03 grupos de acordo com a expressão de 01 ou 02 cópias do epítipo compartilhado ou expressão de um alelo não associado à doença. Esses resultados foram comparados com os de 104 controles saudáveis. O número de pacientes acometidos por VR foi 11, (n=3 com mononeurite múltipla ou neuropatia periférica) e (n=8 úlceras cutâneas profundas). A frequência do HLA-DRB1\*04 foi maior nos pacientes do que nos controles. A análise dos subtipos HLA-DRB1\*01 e \*04 revelou frequência maior do DRB1\*0101 e DRB1\*0401 nos pacientes do que nos controles. Em relação aos casos de VR o trabalho foi discordante do realizado na América do Norte por Weyand et al. (50), que relatou uma associação da VR com o alelo HLA-DRB1\*0401, porém não foi encontrada uma relação clara do epítipo compartilhado

com a VR (úlceras cutâneas profundas e neuropatia periférica), apenas um risco maior de associação com o alelo HLA-DRB1\*0401 com lesões de pele menores (petéquias ou púrpura).

A Tabela 3 resume de forma sucinta e correlacionada os resultados dos principais trabalhos sobre associação do HLA e VR.

**TABELA 3**  
**ARTRITE REUMATÓIDE**  
**PRINCIPAIS TRABALHOS ESTUDANDO A CORRELAÇÃO DO HLA COM**  
**VASCULITE REUMATÓIDE**

<b>Referência</b>	<b>Correlação</b>	<b>HLA</b>
Cunningham (1982)	C	HLA-DR3
Bernelot (1988)	Correlação da VR ao fator reumatóide	N
Salvarani (1992)	Correlação do HLA-DR4 com AR	N
Hutchings (1993)	Correlação negativa do HLA-DP para VR	N
Seitz (1996)	Correlação do HLA-DRB1 com AR	N
Tourissot (1999)	C	
Voskuyl (1997)	C	HLA-DRB1*04
Turesson (2005)	C	
Weyand (1995)	C	
Bértolo (1996)	C	
Voskuyl (1997)	C	HLA-DRB1*0401
Perdriger (1997)	C	
Gorman (2004)	C	
Gladman e Anhorn (1986)	Correlação do HLA-DR4 com AR	N
Watts (2004)	Corticóide como fator de risco para VR	N
Turesson (2006)	O tabagismo é fator independente para a VR	HLA-C3

N=NENHUMA CORRELAÇÃO

C=CORRELAÇÃO

## 2. OBJETIVOS

O objetivo foi avaliar a frequência e a associação clínica do HLA classe I e II em pacientes brasileiros com AR e VR da região de Campinas – SP e estabelecer uma correlação de um HLA específico com a suscetibilidade em se desenvolver VR e correlacionar a variabilidade de apresentação do HLA classe I e II nestes pacientes com o DAS 28.

## 3. SUJEITOS E MÉTODOS

### 3.1 Sujeitos

O tipo de estudo utilizado foi o caso-controle observacional. Foram estudados no total 57 pacientes com diagnóstico de AR provenientes do ambulatório de Reumatologia do HC-UNICAMP, sendo 40 pacientes com diagnóstico de AR, porém sem história de vasculite cutânea; e 17 pacientes com diagnóstico de AR e com pelo menos um episódio de úlcera cutânea profunda causada por vasculite comprovada pela clínica e/ou biópsia de pele.

### 3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram pacientes adultos com diagnóstico de AR baseados nos critérios classificatórios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1987 ([www.rheumatology.org](http://www.rheumatology.org)) em acompanhamento no ambulatório de Reumatologia do HC-UNICAMP. Foram incluídos no presente estudo pacientes masculinos e femininos entre a faixa etária de adultos jovens a idosos (17-78anos).

Foram considerados pacientes acometidos por VR aqueles que preenchiam pelo menos um dos critérios de Scott e Bacon, no caso deste estudo a presença de úlceras cutâneas profundas.

Uma ficha padrão com os dados clínicos e laboratoriais obtidos através de análise de prontuário foi elaborada para padronizar a pesquisa, incluindo DAS 28, idade, raça, tempo de AR e critérios de classificação para AR e VR já citados (Anexo 1), fator reumatóide, peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) e VHS. A raça foi definida pelo próprio paciente frente a análise de seus ancestrais e avaliada pelo pesquisador.

Foram excluídos da pesquisa pacientes com outros diagnósticos de doenças reumáticas e doenças difusas do tecido conjuntivo, tabagistas, crianças (idade < 16 anos) e pacientes que tiveram outras causas de vasculopatia cutânea que não a AR.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética da FCM/UNICAMP e aprovado conforme consta no anexo 2.

### **3.3 Extração do DNA**

A extração de DNA genômico foi feita com kit GFX (289042-64), a partir de 4,5 ml de sangue periférico, colhidos em frasco de vacutainer, com EDTA 15% como anticoagulante. A amostra foi centrifugada a 1500 a 1700 rpm, por 10 minutos. Após o plasma foi descartado e as hemácias serão lisadas com uma mistura de soluções de cloreto de amônio NH<sub>4</sub>Cl 0,144M – 9ml e bicarbonato de amônio NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,01M – 1ml. Depois de 10 minutos, em repouso, à temperatura ambiente, o hemolisado será centrifugado a 13000 a 16000 rpm, por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e o processo de lise repetido até que se obtenha um pellet de células brancas livre de hemácias. A esse pellet foi adicionado 400µl de tampão de lise tipo 10 do kit e 20µl de proteinase K. Foi agitado no vórtex e incubado por 20 minutos agitando de vez em quando e depois transferido para coluna de sílica e centrifugado a 13000 a 16000 rpm por 1 minuto. Foram adicionados 500µl de tampão de lise tipo 10 do kit e depois centrifugado a 13000 a 16000 rpm por 1 minuto. Após foi colocado 500µl de solução de lavagem tipo 6 do kit e centrifugado a 13000 a 16000 rpm por 3

minutos; depois transferido da coluna para um tubo de “eppendorf” e colocado 200µl de solução de eluição pré-aquecida a 70°C ou H<sub>2</sub>O e incubado por 1 minuto. Novamente centrifugado a 13000 a 16000 rpm por 1 minuto e posteriormente guardado o tubo contendo DNA em freezer a -20° C.

### **3.4 Genotipagem do HLA**

#### **3.4.1 Classe I**

##### **3.4.1.1 Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers” HLA-classe I (HLA micro SSP™ - One Lambda , Inc.,California) de baixa resolução.**

A genotipagem do HLA-classe I foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências específicas de primers (PCR-HLA micro SSP™ - One Lambda Inc., California). Para cada amostra de DNA dos pacientes e controles, foram realizados os seguintes procedimentos: em placas de 96 poços contendo “primers” liofilizados (um par de “primers” de região conservada da b globina humana como controle interno da reação, e um par de “primers” específicos dos alelos do HLA-classe I) foi adicionado 10 µl de uma solução contendo: tampão PCR, glicerol, nucleotídeos dCTP, dGTP, dATP, dTTP, vermelho cresol, 111 µl da amostra do DNA (~50ng/µl) e 5,6µl de Taq DNA Polymerase (Fermentas life sciences). Em seguida, a amplificação da PCR foi realizada em um termociclador (Progênie), num total 30 ciclos.

#### **3.4.2 Classe II**

##### **3.4.2.1 Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers” (PCR-SSP HLA-DRB1\* baixa resolução – DYNAL, Biotech Ltd., UK)**

A genotipagem do HLA-DRB1\* foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências específicas de primers (PCR-SSP

HLA-DRB1\* baixa resolução – DYNAL, Biotech Ltd., UK). Para cada amostra de DNA dos pacientes, foram realizados os seguintes procedimentos: em placas de 24 poços contendo “primers” liofilizados (um par de “primers” do gene do crescimento humano de seqüência não alélica como controle interno da reação, e um par de “primers” específicos do HLA-DRB1\*) foi adicionado 10 µl de uma solução contendo: 224 µl (tampão PCR, glicerol 5%, nucleotídeos dCTP, dGTP, dATP, dTTP, vermelho cresol), 53,2 µl da amostra do DNA (~50ng/µl) e 2,24µl de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Em seguida, a amplificação da PCR foi realizada em um termociclador, num total 30 ciclos com desnaturação inicial a 96°C durante dois minutos, seguida dos 10 primeiros ciclos com desnaturação a 96°C, por 15 segundos, pareamento e extensão a 65°C, por 60 segundos e após 20 ciclos com desnaturação a 96°C, por 10 segundos, anelamento a 61°C, por 50 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos.

#### **3.4.2.2 PCR-SSP-HLA-DQB1 de baixa resolução (PCR-SSP HLA-DqB1\* baixa resolução – DYNAL, Biotech Ltd., UK)**

A genotipagem do HLA-DQB1\* foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências específicas de primers (PCR-SSP HLA-DQ baixa resolução – DYNAL, Biotech Ltd., UK). Para cada amostra de DNA dos pacientes, foram realizados os seguintes procedimentos: em placas de 08 poços contendo “primers” liofilizados (um par de “primers” do gene do crescimento humano de seqüência não alélica como controle interno da reação, e um par de “primers” específicos do HLA-DQB1\*) foi adicionado 10 µl de uma solução contendo: 80 µl (tampão PCR, glicerol 5%, nucleotídeos dCTP, dGTP, dATP, dTTP, vermelho cresol), 19 µl da amostra do DNA (~50ng/µl) e 0,8µl de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Em seguida, a amplificação da PCR foi realizada em um Termociclador, num total 30 ciclos com desnaturação inicial a

96°C durante dois minutos, seguida dos 10 primeiros ciclos com desnaturação a 96°C, por 15 segundos, pareamento e extensão a 65°C, por 60 segundos e após 20 ciclos com desnaturação a 96°C, por 10 segundos, anelamento a 61°C, por 50 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos.

#### **3.4.2.3 Detecção dos Produtos Amplificados pela PCR classe I.**

Após a reação de amplificação, 7µl do produto da PCR de cada poço da placa, serão aplicados em um sistema de eletroforese, gel micro SSP (One Lambda, California), contendo gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Após 3 a 4 minutos de corrida, os produtos da PCR foram visualizados sob iluminação ultravioleta, capturados através de um sistema de imagem e impressos para documentação e posterior análise dos resultados.

#### **3.4.2.4 Detecção dos Produtos Amplificados pela PCR classe II.**

Após a reação de amplificação, 4µl do produto da PCR de cada poço da placa, foram aplicados em uma cuba de eletroforese horizontal contendo gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Após 30 minutos de corrida, os produtos da PCR foram visualizados sob iluminação ultravioleta e o gel fotografado utilizando o sistema Polaroid, para documentação e posterior análise dos resultados.

#### **3.4.2.5 Análise dos Resultados**

Através de uma tabela fornecida pelo Kit One Lambda e Dynal foram realizadas as interpretações dos produtos obtidos pela reação em cadeia da polimerase, identificando os alelos do antígeno HLA-classe I e classe II, presentes nas amostras de DNA dos pacientes e controles.

### **3.5 Determinação do anti-CCP**

#### **3.5.1 Quantificação dos autoanticorpos, anti-CCP3 IgG, pelo ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Após a coleta, o soro foi separado e as amostras permaneceram à temperatura ambiente, não mais que 8 horas se o teste for concluído dentro deste período, caso contrário o soro foi estocado entre 2-8°C. Se o teste não foi concluído dentro de 48 horas, as amostras foram refrigeradas em -20°C ou abaixo. Ensaios imunoenzimáticos utilizando o QUANTA Lite™ anti CCP3 IgG (INOVA) para a detecção semiquantitativa de anticorpos em soro humano, foram realizados utilizando os seguintes procedimentos: Antes de começar todos os reagentes e amostras foram homogeneizados e ficaram à temperatura ambiente (20-26°C). A solução de lavagem (tampão salina tris e tween 20) foi diluída em 1:40, adicionando-se o conteúdo do frasco de solução de lavagem a 975ml de água destilada ou deionizada. A amostra de cada paciente foi diluída em 1:101, misturando-se 5 microlitros da amostra para 500 microlitros do diluente das amostras (tampão salina tris, tween 20, estabilizadores protéicos e conservantes). Para o teste foi utilizada uma curva padrão de 5 pontos (calibradores pré-diluídos anti CCP3 IgG de A-E) ELISA. foram adicionados então à placa, 100 microlitros dos, calibradores (A positivo alto, B, C, D, E), positivo baixo CCP3 IgG ELISA, controle negativo ELISA que se encontraram pré-diluídos no Kit, e as amostras dos pacientes diluídas aos respectivos micropoços da placa. Após, a placa foi incubada durante 30 minutos à temperatura, em uma superfície nivelada. O tempo de incubação era contado a partir da adição da última amostra.

#### **3.5.2 Lavagem:**

Foram aspirados completamente os conteúdos de cada cavidade e adicionados 300 microlitros de solução de lavagem a todos os poços e em seguida uma nova aspiração foi feita. Este procedimento foi repetido mais duas vezes num total de três lavagens. Depois da última lavagem, a placa foi invertida e colocada sobre um papel absorvente para retirar qualquer líquido residual. Após, foram adicionados 100 microlitros do conjugado CCP3 IgG em cada micropoço da placa e a mesma incubada por 30 min. A lavagem foi repetida depois da incubação e 100 microlitos do cromógeno TMB foram colocados em cada micropoço. A incubação nesta etapa foi no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Ao término da incubação foram adicionados 100 microlitros de solução de parada (ácido sulfúrico 0,3334 M) em cada micropoço. A densidade óptica (DO) de cada amostra foi feita a 450nm num prazo de 1 hora após a suspensão da reação.

### **3.5.3 Controle de Qualidade:**

O positivo baixo CCP3 IgG, os calibradores (A positivo alto, B, C, D, E), e o controle negativo ELISA foram introduzidos em todos os ensaios, para garantir que todos os reagentes e procedimentos atuem corretamente. Uma vez que o positivo baixo CCP3 IgG, os calibradores (A positivo alto, B, C, D, E), e o controle negativo ELISA sejam pré-diluídos, estes não controlam o procedimento associado à diluição das amostras. Para que os resultados dos testes sejam considerados válidos, todos os critérios listados devem ser cumpridos. Se qualquer um destes critérios não tiver sido cumprido, o teste foi considerado inválido e repetido.

**A.** A absorbância do positivo alto ELISA pré-diluído deverá ser maior que a absorbância do positivo baixo ELISA pré-diluído, que por sua vez deverá ser maior que a absorbância do controle negativo ELISA.

**B.** O positivo alto ELISA pré-diluído deverá ter uma absorvância maior que 1.0, enquanto que a absorvância do controle negativo ELISA não poderá ser maior que 0.2.

**C.** O positivo baixo ELISA deverá ter absorvância duas vezes maior que o controle negativo ELISA ou oscilar entre 0.25 e 0.6 unidades de densidade óptica.

**D.** O controle negativo ELISA e o positivo alto ELISA serão para monitorarem falhas das substâncias nos reagentes. O positivo alto ELISA não assegurará a precisão no ponto de decisão do teste.

#### **3.5.4 Cálculo de Resultados:**

Em primeiro lugar foi determinada a densidade óptica média (DO) para cada conjunto de duplicatas e depois a reatividade para cada amostra dividindo a densidade óptica média da amostra pela densidade óptica média do positivo baixo ELISA. O resultado foi multiplicado pelo número de unidades do positivo baixo ELISA que se encontra no rótulo.

DO da amostra

$$\begin{aligned} \text{Valor de amostra} &= \text{Valor ELISA Positivo Baixo (unidade)} \\ &\times \text{Valor ELISA Positivo Baixo (unidade)} \\ &\text{DO ELISA Positivo Baixo} \end{aligned}$$

#### **3.5.5 Interpretação dos resultados:**

Valor considerado positivo > 22 UI/dl

Valores considerados indeterminados 18 a 22 UI/dl

Valor considerado negativo <18 UI/dl

### **3.6 Métodos estatísticos**

A frequência dos alelos observada em pacientes e controles foram comparadas através da aplicação do teste exato de Fisher e o  $\chi^2$  de Pearson para verificar a relação entre alelos e variáveis categóricas. Para as variáveis numéricas como o DAS 28 e o tempo de doença foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Os *P* valores foram considerados significativos quando o  $P \leq 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Comparação em relação ao sexo, idade, raça, tempo de AR e DAS 28 nos pacientes com AR.**

Dos 40 pacientes com AR sem VR aleatoriamente recrutados 9 (22,5%) eram homens e 31 (77,5%) eram mulheres. Os 17 pacientes com AR com VR aleatoriamente recrutados 2 (11,8%) eram homens e 15 (88,2%) eram mulheres. Houve um predomínio de brancos em ambos os grupos com AR. A média de idade encontrada para os pacientes com AR sem VR foi de 54,77 anos e para os pacientes com AR e com VR de 57,88 anos. A média de tempo de AR para os pacientes com AR sem VR foi de 11,7 anos e para os pacientes com AR com VR de 13,11 anos. O “rank” médio do DAS 28 para os pacientes com AR sem VR foi de 24,35 e para os pacientes com AR com VR de 39,94 (Tabela 4).

**TABELA 4** - Comparação dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais no grupo total (N=57).

Variáveis	AR (n=40)	VR (n=17)	P
<b>Sexo</b>			
Feminino	31(77.5%)	15(88.2%)	ns
Masculino	9(22.5%)	2(11.8%)	
<b>Raça</b>			
Branco	20(50%)	12(70.58%)	
Mulato	11(25.5%)	3(17.64%)	ns
Negro	9(22.5%)	2(11.76%)	
<b>Idade (anos)</b>			
média	54.77	57.88	ns
min-max	17-78	32-71	
<b>Tempo AR (anos)</b>			
média	11.07	13.11	ns
min-max	4-19	4-19	
<b>DAS 28</b>			
rank médio	24.35	39.94	0.001*
FR	30(75%)	16(94.1%)	ns
anti-CCP	27(67.5%)	13(76.5%)	ns

AR, artrite reumatóide; VR, vasculite reumatóide; FR, fator reumatóide; anti-CCP, peptídeo citrulinado cíclico; DAS 28, escore de atividade da doença; min, mínimo; max, máximo; ns, não significante; \* $P < 0.05$ .

#### 4.2 Frequência em relação ao fator reumatóide (FR) e peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) nos pacientes com AR.

Nos 40 controles com AR e sem VR foi observada a presença do FR em 30 (75%) e ausência em 10 (25%). Nos 17 pacientes com AR e com VR foi observada a presença do FR em 16 (94,1%) e ausência em 1 (5,9%) (Gráfico 1).

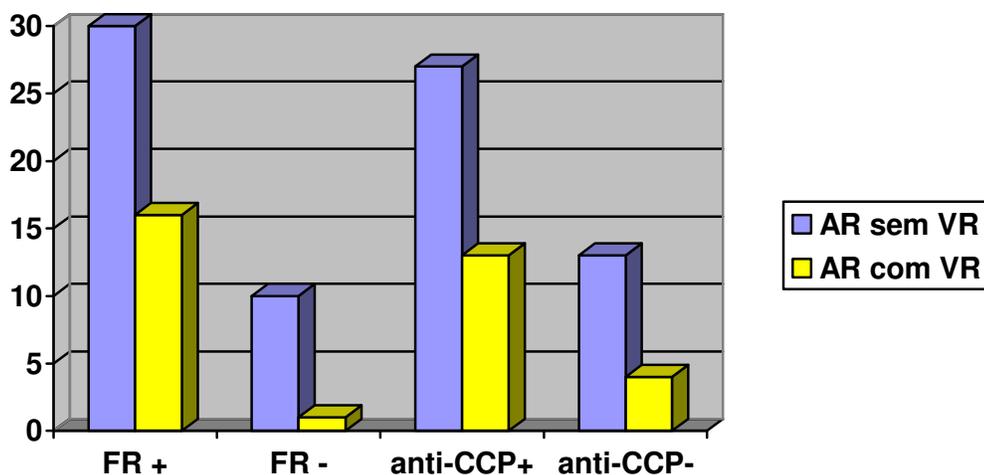


Gráfico 1 – Frequência quanto ao FR e anti-CCP nos pacientes com AR.

#### 4.3 Análise comparativa entre controles com AR e sem VR versus pacientes com AR e com VR.

A comparação entre os dois grupos acima visou estabelecer qual o alelo HLA classe I ou II é o mais freqüente e que estaria envolvido no desenvolvimento ou na proteção da VR. Os resultados significativos estão expressos na tabela 5.

**TABELA 5** – Distribuição dos alelos classe I e II em pacientes com AR sem VR e pacientes AR com VR.

Alelo HLA	AR s/ VR	AR c/ VR	<i>P</i> *
B*14	NE	<b>4</b> (23,52%)	0,006
Cw*08	NE	<b>4</b> (23,52%)	0,006
DRB5	<b>9</b> (22,5%)	NE	0,048

NE = não encontrado. Em negrito = N significante \* calculado pelo teste de Fisher

#### **4.4 Atividade da doença (DAS 28) e os alelos HLA classe I e II no grupo total de pacientes com AR.**

Quanto à atividade da doença nos pacientes sem VR observou-se frequência aumentada do HLA-B\*15 ( $p=0.033$ ) e HLA-DRB1\*01 ( $P=0.014$ ) com média de DAS 28  $>3.2 \leq 5.1$  e o HLA-Cw\*16 ( $P=0.027$ ) e HLA-B\*07 ( $P=0.027$ ) com média de DAS 28  $>5$  (Tabela 6). Não houve significância estatística de qualquer classe do HLA com o DAS 28 nos pacientes com VR.

**TABELA 6** - Média do DAS 28 e frequência (%) dos alelos no grupo total (N=57).

Frequência Alélica	Grupos AR (n=40) VR (n=17)	DAS 28 > 5.1	DAS 28 >3.2 ≤ 5.1	P
B*07	AR	4 (10%)	-	0.027*
	VR	2 (11.76%)	-	ns
B*15	AR	-	8 (20%)	0.033*
	VR	-	1 (5.88%)	ns
Cw*16	AR	5 (12.5%)	-	0.027*
	VR	1 (5.88%)	-	ns
DRB1*01	AR	-	6 (15%)	0.014*
	VR	3 (17.64%)	-	ns

\* $P < 0.05$ ; ns, não significante; AR, artrite reumatóide; VR, vasculite reumatóide.

#### **4.5 Correlação da atividade da doença através do DAS 28 e tempo da doença versus os alelos HLA classe I e II nos pacientes com AR e com VR.**

O intuito foi estabelecer uma correlação significativamente estatística entre a atividade da doença na presença da VR com um alelo HLA classe I ou II no momento da coleta de dados para a pesquisa e com isso predizer na amostra uma correlação positiva entre o DAS 28 e o tempo de diagnóstico da AR frente a um alelo específico.

O que encontramos foi uma correlação estatística positiva apenas para o tempo de doença ( $P=0,035$  – teste de Mann Whitney) frente ao HLA-DQB1\*05  $n=5(29,41\%)$ .

## 5. DISCUSSÃO

Como observado em estudos anteriores (3), a presente casuística demonstrou comportamento semelhante da média de idade tanto em pacientes com AR e com VR como em pacientes com AR e sem VR, respectivamente de 57,88 anos e 54,77 anos. As manifestações extra-articulares que se expressam em torno de 5% dos casos de AR como previamente observado (5), também revelou uma incidência semelhante na casuística do presente estudo em relação à população geral de doentes com AR do ambulatório de Reumatologia da FCM/UNICAMP.

Em relação à incidência sobre os sexos como já observado (3,7), a presente casuística foi concordante com o já previamente observado na AR sendo para os pacientes com AR e sem VR uma frequência de 22,5% homens e 77,5% mulheres. Nos pacientes com AR e com VR uma frequência de 11,8% homens e 88,2% mulheres foi observada, no entanto, em relação à VR estudos demonstram predomínio no sexo masculino (5,13). Quanto à presença do FR, que em pacientes com VR aparece em torno de 80% dos casos (6), o presente estudo demonstrou porcentagem um pouco superior, de 94,1%. Com relação ao anti-CCP que está presente em torno de 60% dos pacientes com AR (3), este trabalho demonstrou frequência de 67,5% e 76,5% respectivamente em pacientes com AR sem VR e com AR com VR.

A presença do FR está envolvida nas formas mais graves da doença (incluindo a VR) segundo MacGregor e Silman apud Stastny P (8) o que foi observado na presente casuística como verificado pela porcentagem de positividade do FR (94,1%) observada nos pacientes com AR e com VR; da mesma forma como a positividade para o anti-CCP pode ser um preditor para a presença da VR principalmente de membros inferiores (26) e que nos pacientes com VR foi de 76,5% (36,37).

Para demonstrar a importância da detecção do HLA seja da classe I ou da classe II nos pacientes com AR foram avaliados pacientes com diagnóstico de VR e pacientes com AR sem VR.

A análise comparativa dos pacientes com AR e com VR e pacientes com AR sem VR evidenciou o HLA classe I: HLA-B\*14 ( $P=0,006$ ) e HLA-Cw\*08 ( $P=0,006$ ) nos pacientes com VR. A análise comparativa mostrou o HLA-DRB5 ( $P=0,048$ ) em pacientes que não desenvolveram VR o que poderia conferir proteção.

Como foi visto a conjunção KIR2DS2 com o ligante HLA-C apropriado pode ter papel no dano vascular por regulação de células T  $CD4^+CD28^-$  (31,24) e no presente estudo a análise de pacientes com AR e sem VR e pacientes com AR e com VR demonstrou o HLA-Cw\*08 ( $P=0,006$ ) como aquele envolvido na suscetibilidade da VR, fato que difere de trabalho anterior que evidenciou o papel do HLA-Cw\*03 no suscetibilidade à VR (24).

Nenhum outro estudo prévio evidenciou a importância do HLA-B na gênese da VR o que foi evidenciado em nossa casuística com importância para o HLA-B\*14 ( $P=0,006$ ) mais evidente em pacientes com VR.

O que a maioria dos estudos elucidam é que há uma associação positiva do HLA classe II, com importância substancial ao HLA-DRB1 na gênese da VR (49-51,58-60) e nenhum estudo abordou o HLA-DR como protetor para VR. Em nossa casuística, entretanto, demonstrou-se a presença do HLA-DRB5 ( $P=0,048$ ) como mais evidente nos pacientes sem VR o que sugere ser ele um fator de proteção.

Todos os pacientes com diagnóstico de AR independente da presença de VR foram submetidos ao DAS 28 para avaliar a atividade da doença no momento da coleta de dados e seus valores foram correlacionados estatisticamente com os alelos HLA classe I e II. Em virtude da VR ser mais comumente observada em pacientes com mais de 10 anos de doença, apesar de ser descrita em qualquer período de evolução de doença e quase sempre estar

correlacionada a um pior prognóstico (13), foi dada ênfase ao tempo de doença dos pacientes com AR e com VR e feita correlação estatística neste grupo com o devido alelo HLA.

Os resultados revelados nos pacientes com AR e sem VR para a associação HLA versus DAS 28 foram os seguintes: HLA-B\*07 ( $P=0,027$ ), HLA-B\*15 ( $P=0,033$ ), HLA-C\*16 ( $P=0,027$ ), HLA-DRB1 ( $P=0,014$ ) e HLA-DRB4 ( $P=0,05$ ); o que prediz nesta amostra que tais alelos estariam ligados a uma maior atividade da doença.

Os resultados dos pacientes com AR e com VR para a associação HLA versus DAS 28 não evidenciou nenhum alelo com significância estatística, possivelmente devido ao número de pacientes ser pequeno e por a entidade VR ser pouco freqüente. Possivelmente com o aumento da amostra de VR através de estudos multicêntricos haja uma mudança nestes achados.

A associação HLA versus o tempo revelou significância estatística para o HLA-DQB1\*05 ( $P=0,035$ ), o que significaria uma maior chance de se desenvolver VR ao longo do tempo da doença.

Comparando os estudos prévios com os do presente estudo em relação às variáveis DAS 28 e tempo observa-se que o aumento da expressão do HLA-DQ e IL-1 pode indicar ativação endotelial sistêmica em pacientes com AR e manifestação extra-articular e pode ser um fator indicador de comorbidade e mortalidade nestes pacientes (28), o que condiz com o achado deste estudo com AR e com VR para o HLA-DQB1\*05, embora o estudo de Perdriger et al (59), tenha demonstrado que o papel do HLA-DQB1\*0302 no desenvolvimento da VR não foi relevante, entretanto, nenhum estudo prévio havia feito a comparação das variáveis DAS 28 e tempo da doença com o sistema HLA.

## 6. CONCLUSÃO

**1a.** Apesar da população brasileira ser miscigenada em geral os achados são semelhantes aos encontrados em populações homogêneas com VR.

**1b.** A VR foi mais evidente em pacientes do sexo feminino, raça branca, RF e anti-CCP positivos.

**2a.** Uma frequência aumentada do HLA-B\*07 e HLA-B\*15 (DAS 28 > 5.1) e HLA-Cw\*16 e HLA-DRB1\*01 (DAS 28 >3.2 ≤ 5.1) foi observada em pacientes sem VR quando avaliados em relação à atividade da doença pelo DAS 28.

**2b.** Não houve associação estatística do HLA com o DAS 28 para os pacientes com VR, no entanto a doença foi mais ativa em pacientes com VR quando comparados com pacientes sem VR.

**3a.** O HLA-DQB1\*05 pode estar envolvido nos casos tardios de AR para a manifestação da VR.

**4a.** O HLA-B\*14 e HLA-Cw\*08 podem estar envolvidos na suscetibilidade para VR, visto estarem presentes de forma significativa em pacientes com VR.

**4b.** O HLA-DRB5\*01 por ser menos freqüente significativamente nestes pacientes com VR podem conferir proteção à esta manifestação extra-articular da AR.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morales-Torres J. Antiquity of RA. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinlatt ME, Weisman MH. **Rheumatology. Fourth Edition**. Philadelphia: Mosby; 2008. p. 751-53.
2. Rothschild BM, Woods RJ, Rothschild C, Sebes JI. Geografic Distribution of Rheumatoid Arthritis in Ancient North America: Implications for Pathogenesis. **Semin Arthritis Rheum** 1992; 22: 181-87.
3. Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. **Am J Med** 2007; 120(11):936-9.
4. Donahue KE, Gartlehner G, Jonas DE, Lux LJ, Thieda P, Jonas BL, et al. Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications of rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med** 2008; 148 (2): 124-34.
5. Genta MS, Genta RM, Gabay C. Systemic rheumatoid vasculitis: a review. **Semin Arthritis Rheum** 2006; 36(2): 88-98.
6. Brasington Júnior RD. Clinical features of rheumatoid arthritis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinlatt ME, Weisman MH. **Rheumatology. Fourth Edition**. Philadelphia: Mosby; 2008. p. 763-71.
7. Macgregor AJ, Silman AJ. Classification and epidemiology. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinlatt ME, Weisman MH. **Rheumatology. Fourth Edition**. Philadelphia: Mosby; 2008. p. 755-61.
8. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. **N Engl J Med** 1978; 298: 869-71.
9. American College of Rheumatology. Disponível em :  
<<http://www.rheumatology.org/publication/classification/ra/ratree.asp?aud=mem>>.  
Acesso em abril de 2008.
10. Louzada Júnior P, Freitas MVC, Oliveira RDR, Deghaide NHS, Conde RA, Bertolo MB, Donadi EA. 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** 2008; 41: 493-9.
11. Turesson C, Matteson EL. Extra-articular features of RA and systemic involvement. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinlatt ME, Weisman MH. **Rheumatology. Fourth Edition**. Philadelphia: Mosby; 2008. p. 773-83.
12. Vollertsen RS, Conn DL. Vasculitis associated with rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am** 1990;16(2): 445-461.
13. Turesson C, Matteson EL. Vasculitis in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol** 2009; 21(1): 35-40.
14. Goronzy JJ, Weyand CM. Vasculitis rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol** 1994; 6(3): 290-4.
15. Suzuki Y, Ohosone M, Obana S, Mita Y, Matsuoka, Irimajiri S., et al. Cause of death in 81 autopsied patients with rheumatoid arthritis. **J Rheum** 1994; 21: 33-6.
16. Kemper JW, Baggenstoss AH, Slocumb CH. The relationship of therapy with cortisone to the incidence of vascular lesions in rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med** 1957; 46: 831-51.
17. Salvarani C, Macchioni P, Mantovani W, Rossi F, Veneziani M, Boiardi L, Lodi L, Portioli I, et al. Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis and HLA antigens in northern Italy. **J Rheumatol** 1992; 19(2): 242-6.
18. Kaye CC, Beckers P, Paquet JE, Arrese GE, Pierard, Malaise MG, et al. The frequency of cutaneous vasculitis is not increased in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. **J Rheumatol** 1996; 23: 253-57.
19. Wattiaux MJ, Kahn MF, Thevenet JP, Sauvezie B, Imbert JC, et al. Vascular involvement in rheumatoid polyarthritis: Retrospective study of 37 cases of rheumatoid polyarthritis with vascular involvement and review of the literature. **Ann Med Interne (Paris)**

- 1987; 138: 566-87.
20. Turesson C, McClelland RL, Christianson TJ, Matteson EL, et al. No decrease overtime in the incidence of vasculitis or other extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis: results from a community-based study. **Arthritis Rheum** 2004a; 50: 3729-31.
21. Voskuyl AE, Zwinderman AH, Westedt ML, Vandenbroucke JP, Breedveld FC, Hazes JM, et al. The mortality of rheumatoid vasculitis compared with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 1996a; 39(2): 266-71.
22. Ward MM. Decreases in rates of hospitalizations for manifestations of severe rheumatoid arthritis, 1983-2001. **Arthritis Rheum** 2004; 50(4): 1122-31.
23. Silman AJ, Newman J, Macgregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a nationwide study of disease-discordant twins. **Arthritis Rheum** 1996; 39: 732-35.
24. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Facobsson LT, Goronzy JJ, Petersson IF, Dechant SA, Nyähll-Wählin BM, Truedsson L, Sturfelt G, Matteson EL, et al. Association of HLA-C3 and smoking with vasculitis in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 2006; 54(9): 2776-83.
25. Voskuyl AR, Zwinderman AH, Westedt ML, et al. Factors associated with the development of vasculitis in rheumatoid arthritis: results of a case-control study. **Ann Rheum Dis** 1996b; 55: 190-92.
26. Turesson C, McClelland RL, Christianson T, Matteson E. Clustering of extraarticular manifestations in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol** 2008; 35: 179-180.
27. Iyngkaran P, Limaye V, Hill C, et al. Rheumatoid vasculitis following influenza vaccination. **Rheumatology** 2003; 42: 907-09.
28. Turesson C, Englund P, Jacobsson LTH, Sturfelt G, Truedsson L, Nennesmo I, Lundberg IE. Increased endothelial expression of HLA-DQ and interleukin 1 alfa in extra-

- articular rheumatoid arthritis. Results from immunohistochemical studies of skeletal muscle. **Rheumatology** 2001; 40: 1346-54.
29. Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D, Weyand CM. Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 1997; 40:1106-1114.
30. Michel FF, Turesson C, Lemster B, et al. CD56-expressing T cells that have senescent features are expanded in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 2007; 56:43-45.
31. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, et al. Major histocompatibility complex class I – recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **J Exp Med** 2001; 193: 1159-67.
32. Janeway, C A; Travers, P; Walport, M; Shlomchik, M. **Imunobiologia – O sistema immune na saúde e na doença. Sexta Edição.** São Paulo: Artmed; 2007. p. 1-777.
33. Achkar A, Stanson AW, Johnson CM, et al. Rheumatoid vasculitis manifesting as intra-abdominal hemorrhage. **Mayo Clin Proc** 1995; 70: 565-9.
34. Agarwal V, Singh R, Wiclaf, et al. A clinical, electrophysiological, and pathological study of neuropathy in rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol** 2008; 27: 841-4.
35. Scott DG, Bacon PA – Intravenous cyclophosphamide plus methyprednisolone in treatment of systemic rheumatoid vasculitis. **Am J Med** 1984; 76: 377-84.
36. Turesson C, Jacobsson LTH, Sturfelt G, et al. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 2007b; 66: 59-64.
37. Laskari K, Ahmadi-Simab K, Lamken M, Csernok E, Gross W. Are anticyclic citrullinated peptide autoantibodies (anti-CCP) a seromarker for rheumatoid vasculitis in a cohort of patients with systemic vasculitis? **Ann Rhem Dis** 2008; 67 (SII): 355.
38. Foster CS, Forstot SL, Wilson LA. Mortality rate in rheumatoid arthritis patients developing necrotizing scleritis or peripheral ulcerative keratitis. Effects of systemic immunosuppression. **Ophthalmology** 1984; (91):1253-63.

39. Jarret SJ, Cunnane G, Conaghan PG, et al. Antitumor necrosis factor-alpha therapy-induced vasculitis: case series. **J Rheumatol** 2003; 30: 2287-91.
40. Turesson C, Matteson EL. Management of extraarticular disease manifestations in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheum** 2004b; 16: 206-11.
41. Turesson C, Jacobsson C, Geborek P, et al. Extra-articular manifestations in a community based sample of patients with rheumatoid arthritis: incidence and relation to treatment with TNF inhibitors. **Arthritis Rheum** 2007c; 56: S709.
42. Puéchal X, Miceli-Richard C, Mejjad O, et al. Antitumour necrosis factor treatment in patients with refractory systemic vasculitis associated with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 2008; 67: 880-84.
43. Maradit-Kremers HM, Nicola PJ, Crowson CS, et al. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. **Arthritis Rheum** 2005; 52: 722-32.
44. Watts RA, Mooney J, Lane SE, Scott DGI, et al. Rheumatoid vasculitis: becoming extinct?. **Rheumatology** 2004; 43:920-23.
45. Turesson C, McClelland RL, Christianson TJ, Matteson EL. Severe extra-articular disease manifestations are associated with an increased risk of first ever cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 2007a; 66: 70-75.
46. Van Halm VP, Peters MJ, Voskuyl AE, et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease, a cross sectional study. The CARRE Investigation. **Ann Rheum Dis** 2008 (Epub ahead of print).
47. Jacobsson LT, Turesson C, Gulfe A, et al. Low incidence of first cardiovascular event in rheumatoid arthritis patients treated with TNF-blockers. **J Rheumatol** 2005; 32: 1213-18.
48. Dixon WG, Watson KD, Lunt M, et al. Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to antitumor necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register.

- Arthritis Rheum** 2007; 56: 2905-12.
49. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LT, Goronzy JJ, Petersson IF, Sturfelt G, Nyhäll-Wahlin BM, Truedsson L, Dechant SA, Matteson EL, et al. The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther** 2005; 7(6): 1386-93.
50. Weyand CM, McCarthy TG, Goronzy JJ. Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest** 1995; 95: 2120-6.
51. Gorman JD, David-Vaudey E, Pai M, Lum RF, Criswell LA, et al. Particular HLA-DRB1 shared epitope genotypes are strongly associated with rheumatoid vasculitis. **Arthritis Rheum** 2004; 50(11): 3476-84.
52. Cunningham TJ, Tait BD, Mathews JD, Muirden KD, et al. Clinical rheumatoid vasculitis associated with the B8 DR3 phenotype. **Rheumatol Int** 1982; 2(3): 137-9.
53. Donadi EA. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina, Ribeirão Preto** 2000; 33: 7-18.
54. Gladman DD, Anhorn KA. HLA and disease manifestations in rheumatoid arthritis a Canadian experience. **J Rheumatol** 1986; 13(2): 274-6.
55. Bernelet Moens HJ, Ament HJ, Vroom TM, Fetkamp TE, Van Der Korst JK, et al. Perivascular infiltration in normal skin of patients with rheumatoid arthritis: association with rheumatoid factors and HLA-DR antigens. **Ann Rheum Dis** 1988; 47: 838-42.
56. Huntchings CJ, Hillarby MC, McMahon MJ, Olliver WE, Grennan DM, et al. HLA-DPA1 and HLA-DPB1 in rheumatoid arthritis and its subsets. **Dis Markers** 1993; 11(1): 37-44.
57. Seitz M, Perler M, Pichler W. Only weak association between disease severity and HLA-DRB1 genes in a Swiss population of rheumatoid arthritis patients. **Rheumatol Int**

- 1996; 16(1): 9-13.
58. Voskuyl AE, Hazes JM, Schreuder GM, Schipper RF, De Vries RR, Breedveld FC, et al. HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 genotypes and risk of vasculitis in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol** 1997; 24(5): 852-5.
59. Perdriger A, Chalès G, Semana G, Guggenbuhl P, Meyer O, Quillivic F, Pawlotsky Y, et al. Role of HLA-DR-DR and DR-DQ associations in the expression of extraarticular manifestations and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol** 1997; 24(7): 1272-6.
60. Toussirot E, Ange B, Tiberghien P, Chabod J, Cedor JP, Wendling D, et al. HLA-DRB1 alleles and shared amino acid sequences in disease susceptibility and severity in patients from eastern France with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol** 1999; 26(7): 1446-51.
61. Bértolo MB. Genotipagem na Artrite Reumatóide. Alelos HLA-classe II: HLA-DRB1\*0101 e \*0102 associados à suscetibilidade e HLA-DRB1\*0401 e \*0404 associados à agressividade [Tese – Doutorado]. Campinas-SP: Universidade Estadual de Campinas; 1996.

## 8. ANEXOS

Anexo 1 – Ficha cadastral dos pacientes avaliados na pesquisa

### **FICHA CADASTRAL**

**PESQUISA:** *“FREQUÊNCIA DOS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA) EM PACIENTES COM VASCULITE CUTÂNEA ASSOCIADA À ARTRITE REUMATÓIDE “*

HC:

NOME:

IDADE:

SEXO:

ETNIA:

FATOR REUMATÓIDE:

ANTI-CCP:

TEMPO DE DOENÇA:

CRITÉRIOS DO ACR PARA AR:

CRITÉRIOS DE SCOTT E BACON:

DAS 28:



restrições o Protocolo de Pesquisa, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2007.

*Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo*  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP



restrições o Protocolo de Pesquisa, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2007.

*Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo*  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP