



ANA PAULA TOLEDO DEL RIO

**FREQUÊNCIA DO HLA CLASSE I E II NA PNEUMOPATIA
INTERSTICIAL E NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM
PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA**

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ANA PAULA TOLEDO DEL RIO

**FREQUÊNCIA DO HLA CLASSE I E II NA PNEUMOPATIA INTERSTICIAL E
NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM PACIENTES COM
ESCLEROSE SISTÊMICA**

Orientador / Supervisor: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ANA PAULA TOLEDO DEL RIO E
ORIENTADA PELO PROF. DR. MANOEL BARROS
BÉRTOLO.

Assinatura do Orientador

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

D387f Del Rio, Ana Paula Toledo, 1980-
Frequência do HLA classe I e II na pneumopatia
intersticial e na hipertensão arterial pulmonar em
pacientes com esclerose sistêmica / Ana Paula Toledo
Del Rio. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Escleroderma sistêmico. 2. Antígenos HLA. 3.
Prognóstico. 4. Fibrose pulmonar. 5. Hipertensão
pulmonar. I. Bértolo, Manoel Barros, 1955-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Class I and II HLA frequency in interstitial lung disease and
pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis

Palavras-chave em inglês:

Scleroderma, Systemic
Human leukocyte antigen
Prognosis
Pulmonary fibrosis
Hypertension, Pulmonary

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Manoel Barros Bértolo [Orientador]
Nome e Sobrenome
Nome e Sobrenome

Data da defesa: 14-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Ana Paula Toledo Del Rio

Orientador: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

Membros:

1. Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

2. Prof. Dr. Rubens Bonfiglioli

3. Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

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

Data: 14/08/2012

Dedico este trabalho...

Ao meu pai Ramón,

*que se mantém presente em nossas vidas como exemplo de trabalho e
superação.*

À minha mãe Ângela,

por seu equilíbrio, amor e dedicação total à nossa família.

Aos meus irmãos Maria Isabel e Ramón,

pela amizade, carinho e cumplicidade.

Ao meu esposo Luis Felipe,

por todo o amor e apoio em todos os momentos importantes de minha vida.

E ao nosso filho Guilherme.

Agradecimentos

Agradeço com todo carinho aos pacientes desta casuística que gentilmente se dispuseram a participar deste estudo.

Agradeço ao Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo pela confiança em mim e apoio durante toda a execução deste projeto.

Agradeço ao Dr. Percival Degrava Sampaio Barros pela idealização deste estudo, auxílio e incentivo durante a execução.

Agradeço à amiga Dra. Zoraida Sachetto pela fundamental ajuda e por toda a dedicação e carinho na coorientação deste estudo.

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Dra. Nazira Mahayri e Dr. Júlio César Sachet, que muito contribuíram para a elaboração final desta dissertação.

Agradeço aos demais docentes, Profa. Dra. Lilian T. Lavras Costallat, Prof. Dr. João Francisco Marques Neto, Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra, Profa. Dra. Simone Appenzeller e Prof. Dr. Adil Muhib Samara, aos colegas Michel, Estephânia, Bruno, Ana Luísa, Juliana e Eduardo, aos residentes e aos funcionários da Disciplina de Reumatologia da FCM-UNICAMP pela amizade e papel fundamental em minha formação pessoal e profissional.

Financiamento

Este estudo foi parcialmente financiado:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

processo no. 2008/58010-3.

O estudo teve a participação da
Disciplina de Reumatologia, Departamento de Clínica Médica – Unicamp
e do Laboratório de Reumatologia – Unicamp.

*Os que se encantam com a prática sem a ciência,
são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola,
nunca tendo certeza do seu destino*

Leonardo da Vinci

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xi
Resumo	xiv
Summary	xvi
1. Introdução	18
2. Justificativa.....	34
3. Objetivos	35
Objetivo Geral	35
Objetivos Específicos	35
4. Métodos.....	36
Seleção de pacientes	36
Métodos laboratoriais	37
Análise estatística	45
5. Resultados	46
6. Discussão.....	51
7. Conclusões.....	54
8. Referências	55
9. Publicação.....	63
Anexo	79
Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	79

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ACR	Colégio Americano de Reumatologia (<i>American College of Rheumatology</i>)
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblasto (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPH/ MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo (<i>connective tissue growth factor</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ES/ SSc	Esclerose sistêmica (<i>Systemic sclerosis</i>)
ESd	Esclerose sistêmica difusa
ESI	Esclerose sistêmica limitada
E-selectina	Selectina endotelial
ET-1	Endotelina-1
EUA	Estados Unidos da América (<i>United States of America</i>)
EULAR	<i>European League against Rheumatism</i>

EUSTAR	<i>EULAR scleroderma trials and research</i>
FAN/ ANA	Fator antinúcleo (<i>antinuclear antibody</i>)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GWAS	<i>Genome Wide Association Study</i>
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HLA	Antígeno leucocitário humano (<i>human leukocyte antigen</i>)
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1 (<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>)
IFN-γ	Interferon gamma
IGF	Fator de crescimento insulina-like (<i>insulin-like growth factor</i>)
IL	Interleucina (<i>interleucin</i>)
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1 (<i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
NK	Células exterminadoras naturais (<i>natural killer cell</i>)
PCR-SSP	Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de primers (<i>PCR using sequence-specific primers</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PI	Pneumopatia intersticial
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
SNPs	polimorfismos de único nucleotídeo (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)

Taq	DNA polimerase termoestável, utilizada na amplificação de fragmentos de DNA através da técnica de PCR
TEB	Tris-Borato-EDTA
TGF- β	Fator de transformação de crescimento- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular-1 (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEDOSS	Diagnóstico muito precoce da ES (<i>Very Early Diagnosis Of SSc</i>)

Resumo

Introdução: A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune caracterizada por disfunção endotelial, vasculopatia obliterativa, fibrose cutânea e visceral. Trata-se de doença poligênica complexa que se manifesta em indivíduos geneticamente predispostos com exposição a fator ambiental ou outro precipitante e seu desenvolvimento depende da interação entre processos imunológicos, vasculares e fibróticos. Estudos genéticos prévios procuram correlacionar os alelos HLA classe I e II e as manifestações clínicas da doença. A fibrose pulmonar (FP) e a hipertensão arterial pulmonar (HAP) são, atualmente, os acometimentos com maior impacto prognóstico e as principais causas de óbito nos pacientes com ES. A expressão do autoanticorpo antitopoisomerase I (anti-Scl70) é um forte preditor de FP, associada à forma difusa e a HAP está relacionada ao anticorpo anticentrômero e à forma limitada da doença. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar a participação do HLA na expressão da doença e suas manifestações clínicas de pior prognóstico (FP e HAP) em pacientes com ES em uma população miscigenada. **Métodos:** Foram incluídos os pacientes com ES seguidos no ambulatório de Reumatologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) de 2008 a 2011. Os dados clínicos foram obtidos através da análise dos prontuários. A genotipagem dos alelos Classe I e II foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências específicas de primers. A análise estatística incluiu o teste exato de Fisher e o teste do qui-quadrado de Pearson. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. A razão de prevalência foi estimada pelo método delta. **Resultados:**

Cento e quarenta e um pacientes (120 mulheres e 21 homens) foram estudados, sendo 33,3% ES difusa, 62,4% ES limitada e 4,3% ES sine scleroderma. A FP foi considerada em 61 pacientes (43,3%), os alelos HLA-A*30 e DQB1*04 foram relacionados à suscetibilidade. No entanto, os alelos HLA-DRB1*01 e DQB1*05 foram relacionados à ausência desta manifestação. A HAP foi diagnosticada em 19 pacientes (13,5%) e teve associação com HLA-B*35 e C*04, enquanto o alelo C*03 pareceu ser protetor. **Conclusões:** Este estudo aponta para associação de alguns alelos do HLA classe I e II às manifestações clínicas de maior morbimortalidade na ES nesta série de casos. Estes achados não foram semelhantes aos encontrados previamente em outras populações, o que evidencia múltiplos padrões genéticos na ES.

Palavras-chave: esclerose sistêmica, antígenos HLA, prognóstico, fibrose pulmonar e hipertensão pulmonar

Summary

Introduction: Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by endothelial dysfunction, occlusive vasculopathy, cutaneous and visceral fibrosis. This is a complex polygenic disease that manifests in genetically predisposed individuals with environmental or other precipitating factor exposure and its development depends on the interaction between immunological, vascular and fibrotic processes. Previous genetic studies aimed to correlate class I and II HLA and the clinical manifestations of the disease. Pulmonary fibrosis (PF) and pulmonary arterial hypertension (PAH) are currently the worse prognostic features and the main causes of death in patients with SSc. The presence of anti-topoisomerase I antibody (anti-Scl70) is a strong predictor of FP, associated with diffuse SSc and PAH is related to anticentromere and the limited form of the disease. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the HLA involvement in disease expression and poor prognostic clinical features, pulmonary fibrosis (PF) and pulmonary arterial hypertension (PAH), in patients diagnosed with systemic sclerosis (SSc) in a multiethnic population. **Methods:** SSc patients followed 2008-2011 were included and clinical data were obtained through records review. Molecular HLA typing was performed (PCR amplification technique using sequence of specific primers). Statistical analysis included Fisher's exact test and Pearson's corrected chi-square test. P values ≤ 0.05 were considered significant. The prevalence ratio was estimated by delta method. **Results:** One hundred forty-one patients (120 women and 21 men) were studied, 33,3% dcSSc, 62,4% lcSSc and 4,3% sine scleroderma. PF was present in 61 patients (43,3%), HLA-A*30 and DQB1*04 were related to

susceptibility. However, HLA-DRB1*01 and DQB1*05 alleles were protective. PAH was diagnosed in 19 (13,5%) and had association with HLA-B*35 and C*04, whereas C*03 seemed to be protective. **Conclusions:** Our current study documents the association of some class I and II HLA alleles with the most severe clinical manifestations in a multiethnic case series. Our findings were not absolutely similar to the previous data in other populations.

Key Words: systemic sclerosis, Human Leukocyte Antigen, prognosis, pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension

1. Introdução

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença inflamatória crônica idiopática, do tecido conjuntivo, caracterizada pelo acometimento do endotélio dos vasos, principalmente capilares e artérias de pequeno calibre, que evolui para endarterite proliferativa isquêmica. Estas alterações vasculares, juntamente com a ativação imune e produção de autoanticorpos específicos, promovem um distúrbio intrínseco do fibroblasto que determina fibrose progressiva cutâneo-visceral, funcionalmente limitante. [1]

Relatada por Hipócrates como “doentes que mumificavam em vida”, foi apenas à partir da descrição de Carlo Curzio em Nápoles (1753) que passou a ser reconhecida como entidade clínica. Em 1832, passou a ser utilizado o termo “esclerodermia”, derivado do grego “skleros” (duro) e “dermis” (pele). Durante o século XIX, foi observada maior mortalidade dos pacientes esclerodérmicos em relação à população geral, mas o envolvimento de órgãos internos só passou a ser considerado como manifestação sistêmica da doença à partir de 1924, após a descrição de fibrose envolvendo rins, pulmões e trato gastrointestinal na necrópsia de cinco pacientes. À partir do reconhecimento de que a esclerodermia era a manifestação cutânea de uma doença generalizada, foi

proposta a denominação “esclerose sistêmica progressiva” (1945). Em 1988, junto com a proposição da atual classificação, foi sugerida a supressão do termo “progressiva”, pelo fato da doença nem sempre apresentar caráter progressivo e pela carga emocional que representava para os pacientes afetados. Surgiu, então, a denominação “esclerose sistêmica”. [2]

É uma doença pouco frequente, cuja incidência varia entre 2,3 e 22,8 casos por milhão de pessoas por ano e a prevalência chega a 50 a 300 casos por milhão de pessoas. [3] A prevalência parece estar aumentando graças à melhora da sobrevida nas últimas décadas. [4]

Predomina no sexo feminino (3-8:1) e costuma manifestar-se entre a terceira e sexta décadas de vida. Em relação à raça, parece haver discreto predomínio em negros. Embora bem menos frequente que a doença no sexo feminino, a ES apresenta curso clínico mais agressivo em homens, onde costuma iniciar-se mais tardiamente. [5] É pouco frequente em crianças e adolescentes e sua gravidade está relacionada ao acometimento de órgãos internos. [6,7]

Apresenta-se, clinicamente, de maneira heterogênea, desde leve fibrose cutânea com envolvimento visceral mínimo a envolvimento cutâneo e visceral graves e de rápida progressão. É possível afirmar que não se trata de uma doença claramente definida, mas de uma síndrome que abrange vários fenótipos.

Em 1980, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) divulgou os critérios preliminares para o diagnóstico da ES, baseado em um estudo multicêntrico comparando 264 pacientes esclerodérmicos com 413 pacientes

controle (com outras doenças do tecido conjuntivo ou fenômeno de Raynaud).

[8] Foram formulados os seguintes critérios:

Critério maior: esclerodermia proximal (às metacarpofalangeanas)

Critérios menores: esclerodactilia; ulcerações de polpas digitais ou reabsorção de falanges distais; fibrose nas bases pulmonares.

Para o diagnóstico da ES é necessária a presença do critério maior ou, na sua ausência, de dois critérios menores. Estes critérios mostraram uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 98%.

Há também a classificação de acordo com a extensão do acometimento cutâneo em formas difusa e limitada, que apresentam complicações clínicas e prognóstico distintos. [1]

A esclerose sistêmica limitada (ESl) apresenta envolvimento cutâneo restrito às extremidades (até cotovelos e joelhos, além da face), ritmo lento de acometimento cutâneo, presença mais frequente de calcinose, incidência tardia de manifestações viscerais, podendo cursar com anticorpo anticentrômero. [5]

A esclerose sistêmica difusa (ESd) cursa com envolvimento cutâneo generalizado afetando tronco, face e membros e apresenta tendência a rápida progressão das alterações cutâneas, contraturas articulares, crepitação tendínea e comprometimento visceral precoce (fibrose pulmonar, miocardiosclerose e crise renal), podendo cursar com anticorpo antitopoisomerase I (anti-Scl 70) e anticorpo anti-RNA polimerase III. [5]

Mais recentemente foi descrita outra forma de manifestação, ES *sine scleroderma*, que se manifesta com fenômeno de Raynaud, acometimento visceral típico e presença de autoanticorpos, sem acometimento cutâneo. [9]

Esforços têm sido feitos pelo EUSTAR (*Eular Scleroderma Trials and Research*) na elaboração de novos critérios diagnósticos que permitam o reconhecimento precoce da doença (*VEDOSS, very early diagnosis of systemic sclerosis*), baseando-se principalmente na presença de fenômeno de Raynaud, edema de mãos, autoanticorpos e capilaroscopia do leito ungueal. Isto possibilitaria rápida intervenção terapêutica e melhora do prognóstico. [10]

A fisiopatologia pode ser explicada didaticamente através de três mecanismos principais: imunológico, em que anormalidades celulares e humorais, incluindo produção de autoanticorpos, promovem infiltrado mononuclear de tecidos e desregulação da produção de citocinas e fatores de crescimento; vascular, com endarterite proliferativa que leva a obliteração do lúmen das pequenas artérias e arteríolas; e fibrótico, com deposição excessiva de colágeno em pele e vísceras acometidas. [11] Eventos imunológicos iniciais e alterações vasculares resultam em ativação de fibroblastos, considerados as células efetoras da doença. [12]

Mecanismo Vascular

As alterações vasculares e das células endoteliais que regulam o tônus dos vasos, manifestando-se clinicamente com o fenômeno de Raynaud, parecem preceder as outras manifestações da ES. Dentre os mediadores desta regulação, destacam-se endotelinas, óxido nítrico, fatores constritores derivados do endotélio, mediadores neurais, humorais e inflamatórios, além da hipóxia e do estresse físico. [13]

A endotelina-1 (ET-1) tem grande importância na patogênese da ES por se tratar do mais potente vasoconstritor endógeno, além de estimulador da fibrogênese. O óxido nítrico regula a ação vasoconstritora da ET-1 nos vasos normais. Um desequilíbrio na ação destas duas substâncias também contribui na patogênese da doença. Os ânions superóxido são liberados pelo endotélio e parecem neutralizar a ação do óxido nítrico, além de oxidar o LDL (lipoproteínas de baixa densidade), o que é citotóxico às próprias células endoteliais. [14]

Há estudos que demonstram, ainda, que os pacientes com ES têm uma deficiência nos precursores endoteliais circulantes e inabilidade destes em se proliferar e se diferenciar. O plasma destes pacientes também parece ser citotóxico às células endoteliais, devido à presença de anticorpos, citocinas e proteinases. [15]

Os pacientes com ES apresentam aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais e elevação de suas formas plasmáticas solúveis (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1). Estas interagem com células inflamatórias como linfócitos T e B, neutrófilos, monócitos, NK (*natural killer*) e plaquetas, levando à adesão e migração destas células para a matriz extracelular. Parece haver correlação entre os níveis plasmáticos destas substâncias e atividade da doença. [16]

Mecanismo imunológico

A ativação contínua de células endoteliais aumentando a regulação de moléculas de adesão, a adesão leucocitária e sua migração para o meio

extravascular, provavelmente, contribui na patogênese da ES. Além disso, agentes inflamatórios como histaminas, quininas, complemento, anticorpos, radicais livres, tromboxane, leucotrienos, LDL oxidados e células-T citotóxicas são possíveis mediadores dos processos imunológicos presentes na ES. [17]

As interações intercelulares provavelmente estimulam a produção e liberação de fatores de crescimento e citocinas capazes de mediar a proliferação e ativação das células vasculares e do tecido conjuntivo, particularmente dos fibroblastos. As principais citocinas envolvidas na patogênese da ES são: fator de transformação do crescimento- β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento insulina-like (IGF), fator básico de crescimento de fibroblasto (bfgf), interleucinas 1, 4, 6, 8 e 17, interferon gamma (IFN- γ), proteína quimiotática de monócitos 1 e 3 e fator de crescimento do tecido conjuntivo. Estas citocinas modulam a interação entre as células, a expressão de moléculas de adesão e a ação dos fibroblastos em resposta aos fatores de crescimento. [18]

Mecanismo de fibrose

Os fibroblastos são as células efetoras e responsáveis pela fibrose na ES. Parece ocorrer uma seleção clonal de fibroblastos hipersecretores com apoptose diminuída, em função da ativação de oncogenes e proteínas antiapoptóticas.

Dessa forma, fibroblastos com sobrevida aumentada seriam responsáveis também pela produção de fibras colágenas tipo I e III e proteínas

da matriz extracelular durante um período mais prolongado. Isto é mais comum em tecidos com concentrações diminuídas de oxigênio. A hipóxia seria então um dos mecanismos ativadores do distúrbio intrínseco do fibroblasto, responsável pelas alterações qualitativas e de distribuição espacial alterada das fibras colágenas, resultando em um estado de fibrose cutâneo-visceral. [19]

Os fibroblastos também são submetidos a mediadores estimulatórios (fatores de crescimento e citocinas como IL-1, IL-6, PDGF e TGF- β). A interação dos fatores estimulatórios e inibitórios sobre os fibroblastos ainda não é bem compreendida.

A fibrose cutânea se inicia na camada inferior da derme e no subcutâneo superior e ocorre simultaneamente à perda da microvasculatura, redução de apêndices e perda da estrutura reticular e das cristas epiteliais. A composição da matriz varia de acordo com a fase da doença. A presença de vários tipos de colágeno, proteoglicanos e fibras elásticas, incluindo a fibrilina, é típica de estágios iniciais. O aumento da síntese de colágeno V foi relacionado à fase ativa da doença em biópsias cutâneas e ao dano endotelial em biópsias pulmonares de pacientes esclerodérmicos. [20,21] O colágeno tipo I acumula-se em fases mais tardias da doença. [22]

Outros mecanismos

Os autoanticorpos, além de marcadores diagnósticos, também parecem influenciar na patogênese da ES. Correlacionam-se também com a gravidade da doença e risco de acometimento de órgãos específicos.

Aproximadamente 95% dos pacientes esclerodérmicos apresentam algum autoanticorpo circulante: o fator antinuclear (FAN) pode ser positivo em mais de 90% dos pacientes, antitopoimerase I (antiScl-70) em 20 a 45%, anticentrômero em 12 a 44%, antifibrilarina, anti-RNAPolimerase, antiPM-Scl, antifibrilina 1(anti-U3 RNP) e antiRNA I, II ou III em 20%. [23]

Apesar de não muito sensível, o anticorpo antitopoimerase I é muito específico para a ES (98 a 100%) e está relacionado a maior risco para doença intersticial pulmonar. Altos títulos também estão associados a envolvimento cutâneo extenso e atividade de doença. Os anticorpos anticentrômero estão associados a envolvimento cutâneo limitado. O estímulo inicial para a produção destes autoanticorpos é desconhecido.

Também têm sido descritos autoanticorpos contra antígenos não nucleares, de superfície celular, como *PDGF* (fator de crescimento derivado de plaquetas), que parecem ter também um papel patogênico ainda não estabelecido. [24]

Em relação ao entendimento da contribuição genética na ES, houve muito progresso nos últimos anos. Parece haver interação de múltiplos genes e há evidências crescentes de que genes associados à autoimunidade têm papel principal no desenvolvimento da doença, enquanto pouco é sabido a respeito da contribuição de genes envolvidos na vasculopatia e processos fibróticos. [25]

Acredita-se que se trate de uma doença poligênica complexa que se manifesta em indivíduos geneticamente predispostos com exposição a fator ambiental ou outro precipitante. [26] Diversos fatores ambientais parecem estar

envolvidos na gênese dos processos colagenogênicos na ES. Dentre estes fatores, podemos destacar os solventes orgânicos (tolueno, benzeno, cloreto de polivinil e tricloroetileno), a sílica (em mineradoras carvão e pedreiras), o silicone (próteses mamárias) e o uso de drogas (inibidores do apetite, L-triptofano e bleomicina).

Alguns estudos envolvendo agregação familiar e irmãos gêmeos, demonstraram que a recorrência da doença nos familiares de pacientes esclerodérmicos era de 1,6% em três coortes norteamericanas que tinham um risco populacional estimado em apenas 0,026%, encontrando-se semelhança no perfil de autoanticorpos destes familiares. [27] Os estudos com gêmeos também mostraram concordância na positividade dos anticorpos antinucleares (90% nos monozigóticos e 40% nos dizigóticos), o que demonstra que a predisposição genética está relacionada a processos de autoimunidade. [28]

Além disto, há a teoria do microquimerismo. Vários relatos indicam que, durante a gestação, linfócitos fetais ou maternos podem atravessar a placenta e iniciar uma reação doador versus hospedeiro que propicia a doença. Há semelhanças clínicas, sorológicas e histopatológicas entre a ES e a doença doador versus hospedeiro, com a presença de células alogênicas no sangue periférico e em biópsias cutâneas em ambos os casos. No entanto, faltam evidências mais rigorosas da participação destas células na patogênese. [19]

Dentre os fatores genéticos destacam-se os alelos do sistema antígeno leucocitário humano (HLA). O complexo HLA consiste em um conjunto de aloantígenos, cuja importância foi reconhecida inicialmente no campo dos transplantes de tecidos e órgãos. Por este motivo, são também denominados

de antígenos de histocompatibilidade, elementos usados pelo sistema imune para diferenciar o próprio do não próprio. [29]

Os genes responsáveis pela codificação dos antígenos HLA localizam-se na região do complexo principal de histocompatibilidade (CPH ou MHC, *main histocompatibility complex*), que corresponde a um pequeno segmento localizado no braço curto do cromossomo 6 humano, região mais polimórfica do genoma. [30]

O complexo contém mais de 220 genes que codificam três classes de moléculas (classes I, II e III), classificadas de acordo com a sua estrutura e função. [31]

A classe I corresponde às moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA A, B e C e estão presentes em praticamente todas as células nucleadas do organismo. A classe II compreende as moléculas HLA DR, DQ e DP, encontradas principalmente nas células que participam do sistema imune como os linfócitos B, linfócitos T ativados, monócitos e macrófagos. Já a classe III, embora esteja incluída dentro do CPH, refere-se a outras moléculas, algumas que fazem parte do sistema imune como fator de necrose tumoral e linfocinas. [32]

Uma grande característica do CPH é o seu extenso polimorfismo, um mesmo gene pode codificar duas ou mais moléculas e cada variante de um gene polimórfico é denominado alelo. Os haplótipos são uma combinação de alelos que não se encontram em equilíbrio de ligamento, ou seja, é um grupo de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) em uma única cromátide que estão estatisticamente associados. Acredita-se que

estas associações e a identificação de alguns alelos de um bloco haplótipo possa identificar, sem ambiguidade, todos os outros sítios polimórficos nesta região. Tal informação é muito valorizada na investigação de genética por trás de doenças comuns.

Este polimorfismo reflete a necessidade de apresentação de diversos repertórios de peptídeos para sobrevivência do sistema imune. A base de dados *IMGT/HLA Database* (www.ebi.ac.uk/imgt/hla) descreve mais de 2000 alelos classe I e 1000 alelos classe II. [31]

As proteínas do HLA participam extensivamente de processos imunológicos. As moléculas classe I e II têm a função de ligarem-se a peptídeos e estes complexos são reconhecidos por receptores de células T, resultando em ativação destas células. As moléculas classe I também ativam receptores de células NK (*natural-killers*). [33]

Os alelos HLA classe II podem contribuir para a patogênese e progressão da ES também através de outros mecanismos que não envolvem a apresentação de antígenos. Tem sido observada sua capacidade em estimular os fibroblastos a secretarem substâncias como a IL-6 e a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), cujos níveis estão aumentados na ES. Isto ocorre principalmente nas formas clínicas associadas ao anticorpo antitopoisomerase. [34]

Os polimorfismos do HLA foram relacionados à ES, tanto em relação à suscetibilidade, quanto à manifestação de autoanticorpos específicos e, por consequência, às características fenotípicas e principais manifestações da doença.

Em relação aos alelos do HLA que conferem maior suscetibilidade à doença, foi encontrada maior frequência dos alelos HLA-DQA1*0501 e DQB1*0301, independente da etnia. O alelo DRB1*1104 está associado à ES em pacientes caucasóides e hispânicos, enquanto o DRB1*0804 foi correlacionado à doença em negros americanos [35] e o DRB1*1502 em japoneses e coreanos. [36] HLA-DRB1*01 e DRB1*11, principalmente DRB1*1101 e DRB1*1104, também foram associados à ES. [35] Em estudo recente de associação gênica (*GWAS, Genome Wide Association Study*), foi encontrada uma forte associação com a região rs6457617 SNP localizada no *HLA DQB1* e este foi considerado o principal alelo relacionado à suscetibilidade e à presença do anticorpo anticentrômero. [38] Zhou e cols. também encontraram associação de polimorfismos dos *loci* HLA-DPB1 e DPB2 com suscetibilidade à ES, principalmente relacionada à presença de antitopoisomerase. [40] No entanto, haplótipos HLA-A*30, A*32, B*57, Cw*14, DRB1*0701, DQA1*0201, DQB1*0202 e DRB1*1501 foram associados a menor risco em desenvolver a doença e podem ser considerados protetores. [40,35]

Considerando as características clínicas, o HLA-DRB1 foi relacionado à forma cutânea limitada e os alelos HLA-B*62, DRB1*11 (DRB1*1104) e DRB1*07 foram mais encontrados na forma cutânea difusa. [40,41]

No entanto, as correlações mais importantes foram demonstradas entre alguns alelos HLA e alguns autoanticorpos específicos da ES, o que também é clinicamente relevante, já que estes estão claramente relacionados às características fenotípicas e ao prognóstico da doença. O anticorpo antitopoisomerase I está relacionado a maior frequência de HLA-DRB1*1104,

DQA1*0501, DQB1*0301 e DPB1*1301. [35] Em relação à raça, foi descrita associação de HLA-DR5 a pacientes caucasóides [42] e DR2 a pacientes japoneses antitopoisomerase positivos. [43] A presença de anticorpo anticentrômero está relacionada aos alelos HLA-DRB1*01, DRB1*04, DQA1*0101 e DQB1*0501 e outros alelos DQB1 com aminoácidos não-polares na posição 26. [44,42,34,35]

Ainda sobre a relação de HLA à presença de autoanticorpos, foi encontrada relação dos haplótipos HLA-DRB1*1302, DQB1*0604 e DQB1*0605 à presença de anticorpo antifibrilarina (anti-U3-RNP), que é mais frequente em negros norteamericanos do sexo masculino e HLA DRB1*0301 com anti-PM-Scl em quase que exclusivamente pacientes brancos. Finalmente, houve associação dos haplótipos HLA-DQB1*0201 em pacientes com RNA-polimerase I, II e III. [44,27]

A associação entre alelos HLA e envolvimento visceral na ES não está bem estabelecida. A pneumopatia intersticial ou fibrose pulmonar (FP) e a hipertensão arterial pulmonar (HAP) são, atualmente, os acometimentos com maior impacto prognóstico e as principais causas de óbito nos pacientes com ES. [45]

A pneumopatia intersticial apresenta alta prevalência nos pacientes esclerodérmicos, cerca de 60 a 90%. É mais comum nos casos de ES com acometimento cutâneo difuso. Seu diagnóstico é relativamente simples, dependente de método não invasivo como a tomografia computadorizada de alta resolução. Na análise histopatológica, o tipo mais comum é a pneumonia intersticial não específica, 78%, que é caracterizada por diversos graus de

inflamação pulmonar e fibrose, com algumas formas que são essencialmente inflamatórias e outras, principalmente fibróticas. Acredita-se que a inflamação seja o estágio inicial da fibrose e focos de faveolamento são raros. Em uma minoria de pacientes esclerodérmicos, encontra-se o padrão histopatológico de pneumopatia intersticial usual. Este padrão é caracterizado por uma distribuição não-uniforme, alternando zonas de pulmão normal com densa fibrose, focos de fibroblastos, escassa inflamação e alteração estrutural em favo de mel. [46]

Nos pacientes com ES, a presença de pneumopatia intersticial aumenta mortalidade. Em um estudo retrospectivo com 953 pacientes com ES, pacientes com FP grave tiveram uma taxa de sobrevida de 30% em nove anos, enquanto nos pacientes que não tinham envolvimento visceral grave, sobrevida foi de 72% neste mesmo período. A queda mais acentuada da capacidade vital forçada (CVF) ocorreu nos primeiros três anos do início da doença, indicando que a lesão pulmonar e fibrose são complicações precoces. [45]

Em relação à fisiopatogenia da pneumopatia, parece haver injúria endotelial de causa imunológica precedendo o processo inflamatório que resulta em fibrose, mas não se sabe qual o gatilho que precipitaria a injúria. [47] A fibrose seria resultante da interação de fibronectina (quimiotaxia de fibroblastos), TGF- β (fator transformador de crescimento- β , estimulador da síntese de matriz extracelular e inibidor da apoptose de miofibroblastos), CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo), endotelina-1 e trombina. [48]

A expressão do autoanticorpo antitopoisomerase I é um forte preditor da pneumopatia intersticial e está associada à forma difusa da doença. Foram encontradas associações com os alelos HLA-DR52a e Cw*0602. [40,49] Outros alelos relacionados à FP na presença de antitopoisomerase foram DRB1*11, principalmente DRB1*1104, [48,42] além de DPB1*1301 e DQB1*0301. [51,52]

Em relação à hipertensão arterial pulmonar (HAP), outra causa importante de mortalidade na ES, apresenta-se principalmente mais tardiamente nos casos de ES com acometimento cutâneo limitado, com prevalência de 5 a 50%, e está associada ao anticorpo anticentrômero. Os índices de mortalidade são de 40 a 60% em dois anos, daí a importância do diagnóstico e tratamento precoces. [53,45]

O ecocardiograma bidimensional com doppler é realizado como método de *screening*, onde é estimada a pressão sistólica da artéria pulmonar. Já o cateterismo cardíaco de câmaras direitas, faz a aferição direta da pressão média na artéria pulmonar e é considerado o método padrão ouro. [54] O diagnóstico é considerado quando a medida estimada da pressão sistólica da artéria pulmonar é maior que 40 mmHg através do ecocardiograma, mas alguns pacientes com pressão entre 35 e 40 mmHg já podem apresentar sinais de insuficiência cardíaca direita. No cateterismo, é feito o diagnóstico de HAP quando a pressão média da artéria pulmonar é maior ou igual a 25 mmHg no repouso. [55]

Trata-se de doença das arteríolas pulmonares, que se caracteriza por aumento progressivo da resistência vascular pulmonar e consequente falência de ventrículo direito. A disfunção vascular provavelmente se inicia após injúria

endotelial, com perda da homeostase dos mediadores da vasodilatação como a prostaciclina e o óxido nítrico. Como consequência, podem ocorrer respostas anormais aos mediadores da vasoconstrição como as catecolaminas.

A injúria endotelial também aumenta a liberação de endotelina-1 (ET-1), que tem importância crucial na patogênese da HAP e na lesão vascular estrutural da doença. A ET-1 é um potente vasoconstritor endógeno e pode induzir genes implicados na disfunção vascular e de resposta inflamatória, promovendo remodelação tecidual e ativação de fibroblastos. Este processo resulta em vasoespasmo, proliferação endotelial e hipertrofia da musculatura lisa. [56]

A produção de ET-1 parece estar associada à presença do HLA-B*35 nos pacientes esclerodérmicos e seria um preditor genético do desenvolvimento da HAP. [57,58] Ainda em relação ao HLA classe I, outros alelos tais como A*30, B*13 e B*65 também foram relacionados. [40]

Em relação ao HLA classe II, uma alta frequência de DRw6 e DRB3 foi associada à HAP e DRw6 também se relacionou a aumento da mortalidade. [50] Os alelos HLA-DRB1*01, DRB1*03 e DQB1*0501 também foram relacionados a HAP na presença de anticorpo anticentrômero. [44,51,52,59]

2. Justificativa

Visamos avaliar a suscetibilidade de pacientes com diagnóstico de ES em desenvolver hipertensão arterial pulmonar e pneumopatia intersticial na presença de alelos do HLA classe I e II e estabelecer qual a frequência mais observada. Com isto, procuramos identificar precocemente pacientes de maior risco para pior evolução clínica.

3. Objetivos

Objetivo Geral

1. Descrever formas clínicas, principais manifestações, positividade e padrão do FAN na casuística e verificar se há associação entre os alelos do HLA e estas características.

Objetivos Específicos

1. Avaliar se existe correlação entre os alelos do HLA classe I e II e a presença de manifestações de pior prognóstico como FP e HAP.
2. Determinar os alelos relacionados a estas manifestações nesta casuística e compará-los aos alelos encontrados em outros estudos.

4. Métodos

Seleção de pacientes

Esta é uma série de casos em que foram incluídos pacientes com diagnóstico de ES pelos critérios do ACR [8], acompanhados de 2008 a 2011 no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas (HC) da UNICAMP. Foram excluídos os pacientes menores de 18 anos e com síndrome de sobreposição.

Foi realizada a coleta de 9 ml de sangue destes pacientes, sob meio asséptico, no Laboratório de Coletas do HC. Todos os pacientes incluídos foram informados sobre os procedimentos da coleta e seus riscos e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a autorização.

Os dados clínicos sobre os pacientes foram obtidos através da análise dos prontuários médicos. Todos os pacientes foram avaliados com exame clínico de rotina e classificados em relação à forma clínica da doença (limitada, difusa e sine scleroderma), exames laboratoriais e padrão de envolvimento visceral. Os acometimentos viscerais considerados foram o gastrointestinal (GI), doença intersticial ou fibrose pulmonar (FP) e hipertensão arterial pulmonar (HAP). O envolvimento renal (crise renal esclerodérmica) não foi considerado

por se tratar de manifestação clínica rara e por não estar presente nesta casuística.

O envolvimento GI foi confirmado por exames de imagem como radiografia contrastada de esôfago, estômago e duodeno (EED), trânsito intestinal, cintilografia de esvaziamento esofágico e endoscopia digestiva alta (EDA).

A FP foi investigada através de prova de função pulmonar (espirometria) e considerada quando a capacidade vital forçada (CVF) era inferior a 70% do previsto. Todos os pacientes também foram submetidos a tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR). Os principais achados tomográficos considerados foram opacidades em vidro fosco, opacidades reticulares e bronquiectasias de tração.

A HAP foi definida quando a pressão sistólica da artéria pulmonar foi estimada em mais de 40 mmHg pelo ecocardiograma Doppler. Esta alteração, por se tratar de resultado examinador-dependente, foi confirmada com um outro ecocardiograma com intervalo mínimo de dois meses. Quando possível, estes pacientes foram submetidos a cateterismo cardíaco confirmatório (pressão média de artéria pulmonar ≥ 25 mm Hg).

A presença e padrão do anticorpo antinuclear (FAN) destes pacientes também foi avaliada.

Métodos laboratoriais

Técnica para Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada pela Metodologia GE Healthcare Illustra Blood, descrita abaixo. Inicialmente, para o primeiro uso do Kit, diluímos a PROTEINASE K com 1,5 ml de água estéril para a PROTEINASE K Kit 30 mg (50 purificações) ou com 3,0 ml de água estéril para a PROTEINASE K Kit 60 mg (250 purificações). Homogeneizamos no vortex até completa dissolução e armazenamos a 4°C.

Posteriormente, adicionamos ETANOL ABSOLUTO no TAMPÃO DE LAVAGEM TIPO 6, 24 ml para o Kit de 50 purificações ou 120 ml para o Kit de 250 purificações. Homogeneizamos por inversão. Colocamos parafilme na tampa para evitar possível evaporação do Etanol e estocamos a temperatura ambiente, como os demais reagentes, exceto a proteína.

Para a extração de DNA, deixamos a amostra de sangue colhido com anticoagulante EDTA bem homogeneizadas e a temperatura ambiente. Em um eppendorf, pipetamos 20 ul da PROTEINASE K e adicionamos entre 50 e 300 ul (preferencialmente 200 ul) de sangue total ou *pellet* no eppendorf com a proteína. Se utilizado o *pellet*, centrifugamos previamente as amostras a 1500 a 1700 rpm por 10 minutos. Pipetamos 400 ul do TAMPÃO DE LISE TIPO 10 (TAMPA VERMELHA) e homogeneizamos em vortex por 15 segundos, quando a cor da amostra passa de vermelho para marrom-esverdeado. Incubamos por 10 minutos e, neste intervalo, intercalamos o vortex. Demos um giro, que permite que o que está na parede e na tampa do eppendorf desça. Transferimos o lisado com o auxílio de uma micropipeta para a coluna de sílica. Centrifugamos a 1400 rpm por 1 minuto. Descartamos o sedimento, mantivemos o coletor. Pipetamos 500 ul do TAMPÃO DE LISE TIPO 10

(TAMPA VERMELHA) e centrifugamos a 1400 rpm por 1 minuto. Descartamos o sedimento, mantendo o coletor. Pipetamos 500 ul do TAMPÃO DE LAVAGEM TIPO 6 (TAMPA AMARELA) e centrifugamos a 1400 rpm por 3 minutos. Descartamos novamente o sedimento e mantivemos o coletor. Centrifugamos, mais uma vez, a 1400 rpm por 1 minuto sem adicionar qualquer outro reagente para que todo o resíduo de ETANOL fosse eliminado nesta etapa. Descartamos o sedimento juntamente com o coletor. Transferimos a sílica para outro eppendorf identificado e pipetamos, no centro da sílica, 200 ul do TAMPÃO DE ELUIÇÃO TIPO 5 pré-aquecido a 70°C. Incubamos por 1 minuto e centrifugamos a 1400 rpm por mais 1 minuto. Descartamos a sílica e mantivemos o eppendorf com o sedimento, que é o DNA pronto para análise. Armazenamos a temperaturas inferiores a -20°C.

Tipagem dos alelos pertencentes à Classe I (A, B, C) e Classe II (DR, DQ) através da reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers” (PCR-SSP)

A genotipagem dos alelos Classe I e II foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências específicas de primers (MICRO SSP HLA DNA Typing Trays da ONE LAMBDA, Inc).

Princípio:

A metodologia de PCR-SSP baseia-se no princípio de que primers de oligonucleotídeos (Adenina, Guanina, Citosina e Timina), que são as bases de um DNA humano com correspondência completa, são utilizados na forma mais

eficaz para amplificar uma sequência alvo do que um primer de oligonucleotídeos sem correspondência por Taq recombinante. Os pares de primers são concebidos para apresentar apenas correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de primers com correspondência perfeita traduzem-se na amplificação de sequência alvo, ou seja, um resultado positivo, enquanto que pares de primers sem correspondência não se traduzem em amplificação, ou seja, um resultado negativo.

Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados serão separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração de Brometo de Etídeo (**Invitrogen**) e exposição à luz ultravioleta (**KODAK Gel Logic 112 UV Transilluminator**).

A interpretação dos resultados PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico. Dado que a amplificação durante a reação de PCR pode ser influenciada adversamente por vários fatores (erros de pipetagem, DNA de qualidade deficiente e presença de inibidores), para garantir a qualidade do DNA, nosso laboratório dispõe do aparelho *Qubit fluorometer* da **Invitrogen**. Através de kit padronizado pela Invitrogen (**Quant-iT dsDNA BR Assay Kit 2-1000 ng**), este aparelho consegue detectar a concentração em que se encontra o DNA (o kit para Detecção de HLA One Lambda pede em torno 25-200 ng/ul, preferencialmente 100 ng/ul com uma relação de A260/A280 de 1,65 a 1,80). É através desta concentração e da pureza do DNA que se evitam bandas fracas, ausentes e até mesmo duvidosas.

Existe um par de primers de controle-interno incluído em todas as reações de PCR. O par de primers do controle amplifica uma região conservada do gene da β -globina humana, que está presente em todas as amostras de DNA. Este controle prova a integridade da reação de PCR. Os fragmentos de DNA amplificados dos pares de primers específicos são menores do que o produto de pares de primers de controle interno.

Após a luz ultravioleta, as imagens são transmitidas através do *KODAK Gel Logic 112 UV Transilluminator* para um computador onde serão visualizadas as imagens, documentadas e armazenadas. A leitura é feita através do **Software HLA Fusion** através do fornecimento dos locais de amplificação. Quando há qualquer problema na identificação dos alelos pelo software, utiliza-se o **Mapa de Trabalho Worksheet** que é um manual, onde é verificada a amplificação e a localização, chegando-se ao resultado de maneira mais trabalhosa. Na leitura da genotipagem recomenda-se sua atualização de acordo com o lote do kit no site do fornecedor www.onelambda.com.

Procedimentos:

Retiramos do freezer -80°C, o kit MICRO SSP HLA DNA Typing Trays da ONE LAMBDA, Inc para Classe I e/ou Classe II, o envelope contendo dentro a microplaca com 96 poços (cada microplaca realiza 3 pacientes, a mesma já vem com os primers no fundo do poço) e o D-Mix ou solução mix (dNTP-tampão, constituída de bases nitrogenadas, $MgCl_2$ e corante vermelho de cresol). Colocamos a microplaca e a solução em banho de gelo.

Pipetamos o volume de Taq Polimerase (**Invitrogen**) no tubo D-Mix, de acordo com o *Quadro de Referência do Produto Micro SSP* (fornecido pelo

site), homogeneizamos em um vortex, acrescentamos 1,0 ul de água ultrapura no poço de controle negativo e pipetamos 9 ul da solução (D-mix e a Taq) no poço controle negativo.

Após ter feito o controle negativo, pipetamos o volume de DNA com sua concentração e pureza dentro dos limites já indicados no tubo D-Mix, de acordo com o *Quadro de Referência do Produto Micro SSP* (fornecido pelo site). Homogeneizamos em um vortex novamente e pipetamos 10 ul nos demais poços, exceto no controle negativo, onde não há primers e não haverá amplificação, o que prova que o teste não está contaminado.

Selamos a placa com fita adesiva fornecida pelo Kit e a colocamos em um termociclador com a almofada de pressão do aparelho por cima. Introduzimos o número do programa PCR-SSP, especificando que o volume da reação será de 10 ul. Iniciado o programa, este tem durabilidade de aproximadamente 1 hora e 16 minutos.

Após o término, retiramos a placa do termociclador e removemos a fita adesiva com cuidado. Transferimos 10 ul em seqüência de cada poço da reação de PCR para o gel de agarose (**Invitrogen**) a 2,0 % com TEB 1X (Tris-Borato-EDTA) no Sistema de Gel Micro SSP. Submetemos o gel, já com as amostras aplicadas, a 140 a 150 volts até que o corante de rastreio vermelho tenha migrado aproximadamente 0,5 cm no gel (cerca de 3 a 5 minutos). Transferimos para o transluminador *KODAK Gel Logic 112 UV*. Por fim, fotografamos e interpretamos os resultados com o Software HLA Fusion ou com o Mapa de Trabalho Worksheet.

Notas: Programa solicitado pela ONE LAMBDA para o Termociclador para PCR- SSP HLA Classe II, fornecido pelo site www.onelambda.com:

Nº Ciclos	Passo	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)
1	1	96	130
1	2	63	60
9	1	96	10
9	2	63	60
20	1	96	10
20	2	59	50
20	3	72	30
Fim	1	4	---

* Para a realização deste projeto, usamos 111,0 ul de DNA com 5,6 ul da enzima *Taq Polymerase* na tipagem da classe I e 39,0 ul de DNA com 2,0 ul da enzima *Taq Polymerase* na classe II. Estes valores são com base no site do fornecedor do Kit para HLA (*One Lambda Inc*) e/ou tabelas impressas que vêm junto com a compra do kit.

Preparo da Solução TEB (Tris Borato EDTA):

Para uma solução final de 1 litro de TEB 10X concentrado, pesamos em uma balança analítica, os seguintes reagentes: EDTA 0,2 molar 7,44 gramas (Titriplex III Merck); TRIS 108 gramas (Invitrogen); e Ácido Bórico 55 gramas (Merck). Em um bécher, adicionamos o EDTA a 100 ml de água ultra-pura

autoclavada, dissolvendo a solução com auxílio de um agitador magnético. Depois do EDTA dissolvido, adicionamos o TRIS e aguardamos a dissolução novamente. Depois, adicionamos o Ácido Bórico pouco a pouco até dissolução total, juntamente com a água.

Colocamos esta solução em um balão volumétrico de 1 litro, completando o volume final e corrigimos seu pH para em torno de 7,0 a 8,0 com o auxílio de um phmetro. Armazenamos a solução em frasco âmbar devidamente etiquetado a 2 a 8°C.

Para preparar TEB 1X, em uma proveta de 1 litro, adicionamos 100 ml de TEB 10X e completamos o restante com água ultra-pura autoclavada (900 ml). Não é necessário aferir pH desta solução. Armazenamos em frasco âmbar etiquetado e mantemos a temperatura ambiente.

Princípio da metodologia PCR:

É uma metodologia que possibilita a reprodução in vitro de milhares de cópias de um determinado fragmento de DNA, através da reação de PCR, com amplificação de uma sequência de interesse, tornando-a majoritária na amostra de DNA. Deste modo, dois pequenos fragmentos de DNA complementares, conhecidos como *primers*, anelam-se às extremidades da região do DNA que se pretende amplificar.

Durante a reação de PCR no termociclador, o intervalo de tempos e temperaturas auxiliam na ação dos primers e da Taq Polimerase (enzima que promove a síntese do DNA). A primeira etapa a 93 a 96°C, provoca a desnaturação do DNA, separando-o em duas fitas simples. Em seguida, a

temperatura é esfriada até 55 a 64°C, para que os primers possam se anelar às regiões complementares das moléculas de DNA que estão separadas. A temperatura é elevada novamente a cerca de 72°C e a Taq Polimerase sintetiza um novo DNA onde os primers agiram. Após esta replicação, é reiniciado o processo para formar novas cópias de DNA. Ao final de 30 ciclos de amplificação, reproduz-se 1 milhão de cópias do DNA de interesse. A temperatura e o tempo variam de acordo com cada tipo de PCR, sua técnica e fornecedor.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo software SPSS para Windows versão 13™. A associação entre alelos do HLA e diferentes características clínicas foi investigada através do teste exato de Fisher e do teste do qui-quadrado corrigido de Pearson. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos após correção para alelos com uma frequência superior a 5%. O método delta foi utilizado para estimar a variância da Razão de Prevalência (RP).

5. Resultados

Foram incluídos 141 pacientes, 120 (85,1%) do sexo feminino e 21 (14,9%) do sexo masculino. Quanto à forma clínica, 47 (33,3%) foram classificados como ES difusa, 88 (62,4%) limitada e 6 (4,3%) sine scleroderma.

Em relação aos padrões do FAN, o centromérico estava presente em 25 (17,7%), nucleolar em 23 (16,3%), outros padrões em 61 (43,3%) e 32 (22,7%) apresentaram FAN negativo.

O cateterismo cardíaco confirmatório foi realizado em 14 dos 19 pacientes com diagnóstico de HAP.

As características clínicas identificadas nesta série de casos estão listadas na tabela 1.

Não houve evidência de associação entre sexo e qualquer outra variável considerada (forma clínica, envolvimento visceral, FAN e alelos do HLA). Não encontramos qualquer associação de alelos HLA com as formas clínicas da doença e com os principais padrões de FAN considerados (centromérico e nucleolar).

Quanto às manifestações clínicas, houve evidência de associação entre a presença de FP e HAP ($p = 0,017$). O envolvimento GI não foi associado a qualquer alelo HLA com significância estatística.

Em relação à FP, houve associação com os seguintes alelos: classe I HLA-A*30 ($p = 0,020$) e classe II DRB1*01 ($p = 0,004$), DQB1*05 ($p < 0,001$) e DQB1*04 ($p = 0,019$). (Tabelas 2 e 3) O HLA-A*30 e o DQB1*04 foram mais freqüentes em pacientes com FP e podem ser considerados fatores de risco para o desenvolvimento desta manifestação (razão de prevalência (RP) = 1,86 e RP = 1,70, respectivamente). No entanto, os alelos HLA-DRB1*01 e DQB1*05 parecem ser protetores em relação ao acometimento pulmonar (RP = 0,38 e RP = 0,41, respectivamente). (Tabela 4)

A HAP esteve relacionada apenas aos alelos classe I: B*35 ($p = 0,035$), C*03 ($p = 0,044$) e C*04 ($p = 0,015$). (Tabelas 2 e 3) O HLA-B*35 e C*04 foram mais freqüentes e associados a maior predisposição (PR = 2,58 e RP = 2,71, respectivamente). No entanto, o alelo C*03 foi menos freqüente e correlacionado negativamente a HAP nestes pacientes (PR = 0,13). (Tabela 5)

Tabela 1. Características clínicas casuística

	N	%
Sexo F:M	120:21	
ES difusa	47	(33,3)
ES limitada	88	(62,4)
ES sine scleroderma	6	(4,3)
Fibrose pulmonar	61	(43,3)
Hipertensão arterial pulmonar	19	(13,5)
Envolvimento gastrintestinal	112	(79,4)
FAN	109	(77,3)

Tabela 2. Frequência dos alelos do HLA Classe I na fibrose pulmonar (FP) e na hipertensão arterial pulmonar (HAP)

HLA	FP			HAP		
	N =61	(%)	p*	N=19	(%)	p*
A*01	13	(21,3)	0,866	4	(21,0)	1
A*02	24	(39,3)	0,208	7	(36,8)	0,421
A*03	12	(19,6)	0,163	5	(26,3)	1
A*33	5	(8,2)	0,746	1	(5,3)	1
A*23	6	(9,8)	0,622	2	(10,6)	0,665
A*11	7	(11,5)	0,271	3	(15,8)	0,207
A*29	6	(9,8)	0,974	2	(10,6)	1
A*30	9	(14,7)	0,020	3	(15,8)	0,207
A*24	9	(14,7)	0,968	1	(5,3)	0,307
A*68	7	(11,5)	0,967	0	(0)	0,129
B*15	9	(14,7)	0,390	1	(5,3)	0,469
B*07	6	(9,8)	0,269	3	(15,8)	0,722
B*44	9	(14,7)	0,532	2	(10,6)	0,530
B*18	12	(19,6)	0,598	5	(26,3)	0,333
B*35	13	(21,3)	0,866	8	(42,1)	0,035
B*39	5	(8,2)	0,548	2	(10,6)	1
B*51	7	(11,5)	0,592	4	(21,0)	0,098
B*08	8	(13,1)	0,269	2	(10,6)	1
B*14	6	(9,8)	0,621	3	(15,8)	0,454
C*03	8	(13,1)	0,477	0	(0)	0,044
C*06	14	(22,9)	0,950	4	(21,0)	1
C*07	28	(46,0)	0,581	10	(52,6)	0,376
C*04	19	(31,1)	0,637	10	(52,6)	0,015
C*05	4	(6,6)	0,170	3	(15,8)	0,428
C*12	7	(11,5)	0,544	1	(5,3)	0,470
C*08	5	(8,2)	0,303	3	(15,8)	0,454
C*02	4	(6,6)	0,242	1	(5,3)	0,693

* Análise univariada dos valores de p calculado com teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher de acordo com o mais apropriado

Tabela 3. Frequência dos alelos do HLA Classe II na fibrose pulmonar (FP) e na hipertensão arterial pulmonar (HAP)

HLA	FP			HAP		
	N =61	(%)	p*	N=19	(%)	p*
DRB1*01	5	(8,2)	0,004	4	(21,0)	0,761
DRB1*04	14	(22,9)	0,950	5	(26,3)	0,769
DRB1*16	3	(4,9)	0,350	0	(0)	0,360
DRB1*11	24	(39,3)	0,186	7	(36,8)	0,727
DRB1*10	1	(1,6)	NC	0	(0)	0,594
DRB1*13	10	(16,4)	0,086	5	(26,3)	0,773
DRB1*08	10	(16,4)	0,099	3	(15,8)	0,454
DRB1*15	14	(22,9)	0,671	3	(15,8)	0,764
DRB1*03	14	(22,9)	0,809	4	(21,0)	1
DRB1*07	9	(14,7)	0,968	1	(5,3)	0,307
DRB1*09	3	(4,9)	NC	1	(5,3)	NC
DRB1*12	3	(4,9)	NC	1	(5,3)	NC
DRB1*14	2	(3,3)	NC	0	(0)	NC
DRB5	13	(21,3)	0,866	2	(10,6)	0,246
DRB5*01	4	(6,6)	NC	1	(5,3)	1
DRB3	11	(18,0)	0,361	2	(10,6)	0,739
DRB3*01	2	(3,3)	0,299	0	(0)	0,690
DRB3*02	28	(46,0)	0,915	10	(52,6)	0,496
DRB4	3	(4,9)	NC	1	(5,3)	NC
DRB4*01	22	(36,0)	0,744	5	(26,3)	0,275
DQB1*03	34	(55,8)	0,93	11	(57,9)	0,808
DQB1*05	11	(18,0)	<0,001	4	(21,0)	0,178
DQB1*06	23	(37,7)	0,782	7	(36,8)	0,835
DQB1*02	19	(31,1)	0,883	4	(21,0)	0,336
DQB1*04	14	(22,9)	0,019	5	(26,3)	0,163

* Análise univariada dos valores de p calculado com teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher de acordo com o mais apropriado, NC=não calculável

Tabela 4. Alelos de risco e proteção para fibrose pulmonar (FP)

Alelos relacionados a FP	RP	(IC 95%)	p*
HLA-A*30	1.86	(1.26 to 2.74)	0.020
HLA-DQB1*04	1.70	(1.17 to 2.48)	0.019
HLA-DQB1*05	0.41	(0.24 to 0.72)	<0.001
HLA-DRB1*01	0.38	(0.17 to 0.85)	0.004

IC 95% = intervalo de confiança de 95%; RP = razão de prevalência; *Análise univariada dos valores de p calculado com teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher de acordo com o mais apropriado.

Tabela 5. Alelos de risco e proteção para hipertensão arterial pulmonar (HAP)

Alelos relacionados a HAP	RP	(IC 95%)	p*
HLA-B*35	2.58	(1.14 to 5.85)	0.035
HLA-C*04	2.71	(1.19 to 6.18)	0.015
HLA-C*03	0.13	(0.01 to 2.14)	0.044

IC 95% = intervalo de confiança de 95%; RP = razão de prevalência; *Análise univariada dos valores de p calculado com teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher de acordo com o mais apropriado.

6. Discussão

Este estudo investigou as frequências de alelos do HLA classe I e II em pacientes esclerodérmicos brasileiros, independentemente de raça ou etnia, e sua associação às principais manifestações clínicas da doença. Este representa o primeiro estudo de genotipagem HLA na ES já realizado em nossa população miscigenada. As pesquisas envolvendo HLA e ES são importantes do ponto de vista tanto etiopatogênico como clínico, na tentativa de se identificar precocemente os pacientes com doença mais grave.

Nesta série de casos, não houve evidência de associação entre o HLA e a forma clínica da doença, baseada na extensão do acometimento cutâneo. Estes resultados não confirmam a associação descrita previamente dos alelos HLA-B*62, DRB1*11 e DRB1*07 a quadro cutâneo mais extenso, com escores mais elevados. [40,41]

Há poucos dados prévios sobre a relação entre HLA e acometimento do trato GI. Não encontrou-se qualquer alelo predisponente nesta casuística provavelmente por se tratar de manifestação muito prevalente, acometendo cerca de 80% dos pacientes.

Quanto às manifestações clínicas, encontramos associação significativa entre FP e HAP, ambos determinantes de pior prognóstico.

A avaliação da genotipagem dos pacientes com FP revelou resultados diferentes dos encontrados na literatura, já que as associações previamente descritas são, geralmente, relacionadas também à presença do anticorpo antitopoisomerase. [44,50-52] Os alelos Cw*0602 e DR52a foram associados à FP, mas, neste estudo, não foram identificados como fator de risco. Em nossa amostra, tanto o HLA-A*30 como o DQB1*04 conferiram suscetibilidade a esta manifestação. Interessante foi A*30 como fator de risco para FP e não para HAP conforme encontrado por Gladman D. et al. [40,49] Além disso, a presença dos alelos DRB1*01 e DQB1*05 foi negativamente relacionada à FP e estes, considerados protetores.

Quanto à HAP, encontramos os alelos B*35 e C*04 como fatores de risco. O HLA B*35 já havia sido relacionado a esta manifestação e parece estar envolvido com o aumento dos níveis de ET-1 e patogênese da HAP. [57,58] Na casuística de Gladman et al. houve associação significativa entre HAP e HLA-A*30, B*13, B*65 e DRB1*03. [40] Esta série de casos não confirmou esses achados e a frequência desses alelos em nossa amostra foi: A*30 em 15,8%, B*13 em 5,3%, DRB1*03 em 21% e nenhum paciente apresentou B*65. Nesta análise, C*03 foi considerado alelo protetor, ausente em todos os pacientes com HAP. Os alelos classe I C*04 e C*03 não tinham sido previamente descritos como relacionados a HAP.

Por fim, este estudo estabelece a associação de alguns alelos do HLA com as manifestações clínicas mais graves da ES em uma casuística

miscigenada. Acreditamos que estudos com HLA na ES poderão clarificar os mecanismos fisiopatológicos através dos quais os alelos HLA podem influir no desencadeamento e na evolução destes casos. Além disto, estudos preliminares sugerem que seria possível atuar diretamente sobre processos autoimunes mediados pelo CPH, com o bloqueio da região apresentadora de antígenos destas moléculas, [60] o que pode representar uma estratégia de imunointervenção na ES no futuro.

Os achados deste estudo não foram absolutamente semelhantes aos dados prévios em outras populações. Com base nos resultados deste e de estudos anteriores, fica nítida a existência de vários padrões genotípicos na ES. Portanto, outros estudos são necessários para melhor caracterização da doença nas diversas populações.

7. Conclusões

1. Não houve associação dos alelos HLA à forma clínica da doença, positividade e padrão do FAN e acometimento gastrointestinal nesta casuística.
2. Encontramos associação de alguns alelos HLA às manifestações clínicas de pior prognóstico (FP e HAP) na ES.
3. Estes alelos não foram os mesmos relacionados previamente em outros estudos, o que sugere a existência de diversos padrões genotípicos na doença.

8. Referências

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15(2): 202-5.
2. Marques-Neto JF, Sampaio-Barros PD. Esclerose Sistêmica. In: Carvalho MA, Lanna CCD, Bértolo MB. Reumatologia: diagnóstico e tratamento. 3 ed.- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p 386.
3. Chiffлот H, Fautzi B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 37: 223-35.
4. Bernatsky S, Joseph L, Pineau CA, Belisle P, Hudson M, Clarke AE. Scleroderma prevalence: Demographic variations in a population-based sample. *Arthritis Rheum* 2009; 61(3): 400-4.
5. Reveille JD. Ethnicity and race in systemic sclerosis: how it affects susceptibility, severity, antibody genetics, and clinical manifestations. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5: 160-7.
6. Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, Schottenfeld D. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*. 2003; 48(8): 2246-55.

7. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38(2): 132-60.
8. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr., et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
9. Poormoghimi H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA Jr. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic factors and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 444-51.
10. Avouac J, Fransen J, Walker UA, Riccieri V, Smith V, Muller C et al. EUSTAR Group Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 476-81.
11. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005 Nov; 26(11): 587-95.
12. Sollberg S, Mauch C, Eches B, Krieg T. The fibroblast in systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994; 12: 379.
13. Pearson JD. The endothelium: its role in scleroderma. *Ann Rheum Dis* 1991; 50 Suppl 4: 866.
14. Kahaleh MB. Endothelin: An endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1991; 34:978.
15. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 603.
16. Sato S. Abnormalities of adhesion molecules and chemokines in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11: 503.

17. Rudnicka L, Majewski S, Blaszczyk M, Skiendzielewska A, Makiela B, Skopinska M et al. Adhesion of peripheral blood mononuclear cells to vascular endothelium in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1992; 35: 771.
18. Denton CP, Bickerstaff MC, Shiwen X, Carulli MT, Haskard DO, Dubois RM et al. Serial circulating adhesion molecule levels reflect disease severity in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 1048.
19. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Mechanisms of Disease: Scleroderma. *N Engl J Med* 2009; 360: 1989-2003.
20. Martin P, Teodoro WR, Velosa AP, de Moraes J, Carrasco S, Christmann RB et al. Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2012; 11(11): 827-35.
21. Parra ER, Aguiar AC Jr, Teodoro WR, de Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir J* 2009; 3(3): 135-42.
22. Perlish JS, Lemlich G, Fleischmajer R. Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 48-54.
23. Reveille JD, Solomon DH. American College of Rheumatology ad hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines: Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70 and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 49: 399.
24. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 2667-76.

25. Romano E, Manetti M, Guiducci S, Ceccarelli C, Allanore Y, Matucci-Cerinic M. The genetics of systemic sclerosis: an update. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29 (Suppl. 65): S75-S86.
26. Agarwal SK, Tan FK, Arnett FC. Genetics and genomic studies in scleroderma (systemic sclerosis). *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34(1): 17-40.
27. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001; 44(6): 1359-62.
28. Feghali-Bostwick C, Medsger TA Jr., Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48(7): 1956-63.
29. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 2.ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1994.
30. Mayes MD, Trojanowska M. Genetic factors in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 Suppl 2: S5.
31. Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research* 2003; 31: 311-4.
32. Trowsdale J. HLA genomics in the third millennium. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(5): 498-504.
33. Karp DR. Novel sequence feature variant type analysis of the HLA genetic association in systemic sclerosis. *Human Molecular Genetics* 2010; 19(4): 707-19.

34. Beretta L, Rueda B, Marchini M, Santaniello A, Simeón CP, Fonollosa V, et al. Analysis of Class II human leucocyte antigens in Italian and Spanish systemic sclerosis. *Rheumatology* 2012; 51: 52-9.
35. Arnett FC, Gourh P, Shete S, Ahn CW, Honey RE, Agarwal SK et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) class II alleles, haplotypes, and epitopes which confer susceptibility or protection in the fibrosing autoimmune disease systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 822-27.
36. Kuwana M, Inoko H, Kameda H, Nojima T, Sato S, Nakamura K et al. HLA class II genes associated with anticentromere antibody in Japanese patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 983-7.
37. Lambert NC, Distler O, Müller-Ladner U, Tylee TS, Furst DE, Nelson JL. HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9): 2005-10.
38. Radstake TR, Gorlova O, Rueda B, Martin JE, Alizadeh BZ, Palomino-Morales R et al. Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet* 2010; 42: 426-9.
39. Zhou X, Lee JE, Arnett FC, Xiong M, Park MY, Yoo YK et al. HLA-DPB1 and DPB2 are genetic loci for systemic sclerosis: a genome-wide association study in Koreans with replication in North Americans. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3807-14.
40. Gladman DD, Kung TN, Siannis F, Pellett F, Farewell VT, Lee P. HLA markers for susceptibility and expression in scleroderma. *J Rheumatol* 2005; 32(8): 1481-7.

41. Loubiere LS, Lambert NC, Madeleine MM, Porter AJ, Mullarkey ME, Panq JM et al. HLA allelic variants encoding DR11 in diffuse and limited systemic sclerosis in Caucasian women. *Rheumatology* 2005; 44: 318-22.
42. Reveille JD, Fischbac M, McNearney T, Friedman AW, Aguilar MB, Lisse J et al. GENISOS Study Group, Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30: 332-46.
43. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Inoko H, Tsuji K. The HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest* 1993; 92(3): 1296-301.
44. Gilchrist FC, Bunn C, Foley PJ, Lympny PA, Black CM, Welsh KI et al. Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun.* 2001; 2(2):76-81.
45. Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(7): 940-4.
46. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(12): 1581-6.
47. Harrison NK, Myers AR, Corrin B, Soosay G, Dewar A, Black CM et al. Structural features of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Am Rev Respir Dis* 1991 Sep; 144(3 Pt 1): 706-13.
48. du Bois RM. Mechanisms of scleroderma-induced lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4(5): 434-8.

49. Langevitz P, Buskila D, Gladman DD, Darlington GA, Farewell VT, Lee P. HLA alleles in systemic sclerosis: association with pulmonary hypertension and outcome. *Br J Rheumatol* 1992 Sep; 31(9): 609-13.
50. Simeón CP, Fonollosa V, Tolosa C, Palou E, Selva A, Solans R et al. Association of HLA Class II Genes with Systemic Sclerosis in Spanish Patients. *J Rheumatol* 2009; 36: 2733-36.
51. Arnett F. C. HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Int Rev Immunol* 1995; 12(2-4): 107-28.
52. Whyte J, Artlett C, Harvey G, Stephens CO, Welsh K, Black C, et al. HLA-DQB1 associations with anti-topoisomerase-1 antibodies in patients with systemic sclerosis and their first degree relatives. United Kingdom Systemic Sclerosis Study Group. *J Autoimmun* 1994; 7: 509-20.
53. Denton CP, Black CM. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29(2): 335-49, vii.
54. Denton CP, Cailles JB, Phillips GD, Wells AU, Black CM, Bois RM. Comparison of Doppler echocardiography and right heart catheterization to assess pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1997; 36(2): 239-43.
55. Galiè N. Introduction: new insights into a challenging disease: A review of the third world symposium on pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43(12): S1.
56. Ramirez A, Varga J. Pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: clinical manifestations, pathophysiology, evaluation, and management. *Treat Respir Med* 2004; 3(6): 339-52.
57. Santaniello A, Salazar G, Lenna S, Antonioli R, Colombo G, Beretta L et al. HLA-B35 upregulates the production of endothelin-1 in HLA-

transfected cells: a possible pathogenetic role in pulmonary hypertension. *Tissue Antigens* 2006; 68(3): 239-44.

58. Lenna S, Townsend DM, Tan FK, Kapanadze B, Markiewicz M, Trojanowska M. et al. HLA-B35 upregulates endothelin-1 and downregulates endothelial nitric oxide synthase via endoplasmic reticulum stress response in endothelial cells. *J Immunol* 2010; 184: 4654-61.
59. Reveille JD, Owerbach D, Goldstein R, Moreda R, Isern RA, Arnett, FC. Association of polar aminoacids at position 26 of the HLA-DQB1 first domain with the anticentromere autoantibody response in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest* 1992; 89:1208-13.
60. Oshima M, Deitiker P, Atassi MZ. Targeting the antigen-binding site of HLA-restricting alleles in treatment of autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2007;27: 271- 288.

9. Publicação

Manuscript 12-269

Para ver mensagens relacionadas a esta, [agrupar mensagens por conversa](#).

[Voltar para mensagens](#) |  

✉ w.van.der.sluijs@iospress.nl [Adicionar a contatos](#)
Para anapauladelrio@hotmail.com

20/06/2012 
[Responder](#) 

Dear Dr. Del,

Thank you for your recent submission of the manuscript entitled "HLA markers for poor prognosis in Systemic Sclerosis Brazilian patients."

It has been assigned tracking number 12-269.

To obtain the history and current status of your manuscript, visit the address presented below and enter your last name as username and the tracking number as password.

Disease Markers Editorial Office

<http://mstracker.com/history1.php?jc=dma>

Disease Markers

History of Manuscript 12-269	
"HLA markers for poor prognosis in Systemic Sclerosis Brazilian patients"	
Date	Action
2012-06-21	Out For Review
2012-06-20	Assigned to Editor (Sluijs)
2012-06-20	Record Created/Needs Editor Assigned
2012-06-20	Acknowledgment Sent to Author
2012-06-20	Manuscript Accessioned
2012-06-19	Manuscript Submitted



HLA markers for poor prognosis in Systemic Sclerosis Brazilian patients

Authors:

Ana Paula Toledo Del Rio¹ M.D.

Zoraida Sachetto¹ M.D., PhD.

Percival Degrava Sampaio-Barros² M.D., PhD.

João Francisco Marques Neto¹ M.D., PhD.

Ana Carolina Santos Londe¹

Manoel Barros Bértolo¹ M.D., PhD.

1. Unit of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

2. Division of Rheumatology, University of São Paulo – USP, São Paulo, Brazil

Address for correspondence:

Ana Paula Toledo Del Rio

Department of Rheumatology, Faculty of Medical Sciences, PO Box 6111 State University of Campinas – UNICAMP, Zip Code 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

e-mail: anapauladelrio@hotmail.com

Acknowledgements

This study was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, grants **2008/58010-3**

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interests.

Abstract

Objectives: The aim of this study was to evaluate the HLA involvement in disease expression and poor prognostic clinical features, pulmonary fibrosis (PF) and pulmonary arterial hypertension (PAH), in patients diagnosed with systemic sclerosis (SSc) in a multiethnic population. **Methods:** SSc patients followed 2008-2011 were included and clinical data were obtained through records review. Molecular HLA typing was performed (PCR amplification technique using sequence of specific primers). Statistical analysis included Fisher's exact test and Pearson's corrected chi-square test. P values ≤ 0.05 were considered significant. The prevalence ratio was estimated by delta method. **Results:** One hundred forty-one patients (120 women and 21 men) were studied, 33,3% dcSSc, 62,4% lcSSc and 4,3% sine scleroderma. PF was present in 61 patients (43,3%), HLA-A*30 and DQB1*04 were related to susceptibility. However, HLA-DRB1*01 and DQB1*05 alleles were protective. PAH was diagnosed in 19 (13,5%) and had association with HLA-B*35 and C*04, whereas C*03 seemed to be protective. **Conclusions:** Our current study documents the association of some class I and II HLA alleles with the most severe clinical manifestations in a multiethnic case series. Our findings were not absolutely similar to the previous data in other populations. **Key Words:** systemic sclerosis, Human Leukocyte Antigen, prognosis, pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease of unknown etiology, characterized by vascular dysfunction, cutaneous and visceral fibrosis. Women are more frequently affected than men with a ratio of 4:11 and the peak incidence is in the fourth and fifth decades of life. The incidence varies from 2.3 to 22.8 / 1 million / year. [1] The prevalence appears to be increasing due to improved survival in recent decades. [2] The affections with greater prognostic impact and the main causes of death in SSc patients are pulmonary fibrosis (PF) and pulmonary arterial hypertension (PAH). [3]

Although the pathogenesis of SSc remains unclear, genetic factors are thought to contribute to the disease. *Human leukocyte antigen* (HLA) genes have been implicated in the susceptibility to SSc and its clinical and serological manifestations. [4-10]

HLA widely participates on immunological processes. Class I (HLA A, B and C) and class II (HLA DR, DQ and DP) molecules are expressed on the cell surface and act in antigen presentation and T lymphocytes activation. Class I molecules also activate natural-killer (NK) cell receptors [11] and class II appear to stimulate the secretion of IL-6 and monocyte chemotactic protein (MCP-1) by fibroblasts, especially in antibody anti-topoisomerase (ATA) associated clinical forms. [12]

The susceptibility to the disease was found to be associated with HLA-DQA1*0501 e DQB1*0301 in all ethnic groups. The allele DRB1*1104 was associated to SSc in Caucasian and Hispanic patients, whereas DRB1*0804 was correlated to the disease in African Americans [13] and DRB1*1502 in Japanese and Koreans. [14] HLA-DRB1*01 and DRB1*11 (mainly DRB1*1101 and DRB1*1104) were also associated to SSc. [15] A multicenter study (GWAS, Genome Wide Association Study) established HLA-DQB1 as the main allele related to susceptibility related to anticentromere antibodies (ACA). [16] Zhou et al. found an association of HLA-DPB1 and DPB2 with increased susceptibility to disease primarily associated with ATA. [17] HLA-A*30, A*32, B*57, Cw14, DRB1*0701, DQA1*0201, DQB1*0202 and DRB1*1501 were identified as protectors. [4,13]

However, much stronger correlations have been demonstrated between certain HLA alleles and each of the SSc-specific autoantibodies. This may be clinically relevant because each of the autoantibody subsets of scleroderma is associated with certain disease features and has different prognostic implications. [14,18-22] ATA antibodies have a higher frequency of HLA-DRB1*1104, DQA1*0501, DQB1*0301 and DPB1*1301. [13] Caucasian patients were

associated to HLA-DR5 [23-25] and Japanese patients to HLA-DR2. [26] ACA was related to HLA-DRB1*01, DRB1*04, DQA1*0101 and DQB1*0501. [7,12,13,23]

Considering the clinical features, HLA-DRB1 has been associated with the limited cutaneous form (lcSSc) and B*62, DRB1*11 (DRB1*1104) and DRB1*07 have been found in the diffuse cutaneous form (dcSSc). [4,9]

The association between HLA alleles and visceral involvement in SSc is not well established. Some previous studies also reported a correlation of internal organ involvement of SSc and autoimmune patterns with different specific serological HLA status and these associations seem to differ according to ethnicity. [7,13]

A high frequency of DRw6 and DRB3 related to PAH has been described by Langevitz et al. and DRw6 was associated with a higher mortality. [27] Some class I alleles were also related such as A*30, B*13, B*65 [4] and B*35, which appears to play a role in the production of endothelin-1 (ET-1) in SSc. [28,29] HLA-DRB1*01, DRB1*03 and DQB1*0501 were also related to PAH and ACA. [30,31]

Similarly, DR52a and Cw*0602 alleles were found more frequently in SSc with PF. [4,27] Other alleles described for PF in the presence of ATA are DRB1*11 (DRB1*1104), [10,32] DPB1*1301 [30] and DQB1*0301. [30,31]

In Brazil, a South American country with a multiethnic population, there is no previous study concerning HLA and SSc.

The aim of this study was to evaluate the HLA involvement in disease expression and its correlation to poor prognostic clinical features in patients diagnosed with SSc at a University referral Hospital in the city of Campinas, State of Sao Paulo, Brazil.

Subjects and methods

Patient selection

We evaluated patients diagnosed with SSc followed for a period of 3 years (2008-2011) in the Rheumatology Department at the University of Campinas Teaching Hospital, a tertiary referral hospital located in the state of São Paulo, Brazil. Clinical data on patients, unrelated ethnically, were obtained through records review.

This study was approved by the Ethics Committee of Campinas State University. Patients provided informed consent.

The SSc diagnosis was based on the American College of Rheumatology (ACR) criteria for SSc. [10] Patients under 18 years old and with overlap syndrome were excluded.

All patients were evaluated for gender, visceral involvement, laboratorial tests and underwent a routine rheumatology examination. They were classified according to cutaneous involvement as diffuse, limited and sine scleroderma forms. Gastrointestinal (GI) involvement, PF and PAH were the visceral involvement considered.

Limited disease was defined as definite skin thickening confined to the distal extremities, whereas in diffuse disease there was in addition involvement of skin proximal to the knees and elbows. The sine scleroderma form was considered according to established criteria. [33,34]

The presence and pattern of the antinuclear antibody (ANA) was also evaluated.

GI tract involvement was confirmed by imaging studies (contrast radiography esophageal emptying scintillography and intestinal transit) and upper gastrointestinal endoscopy.

PAH was defined when the right ventricular pressure was higher than 40 mm Hg by Doppler echocardiogram. The alteration in systolic pulmonary artery, as it is an examiner-dependent result, was confirmed with another echocardiogram on a minimum interval of two months. When possible, these patients underwent confirmatory cardiac catheterism (medium pulmonary arterial pressure ≥ 25 mm Hg). [35]

PF was investigated by pulmonary function testing, forced vital capacity or total lung capacity (TLC) less than 70% of predicted, and High Resolution Computed Tomography (HRCT). The main CT valued findings were hyperdense pulmonary nodules, ground glass, reticular opacities and traction bronchiectasis. [36]

Laboratory methods

DNA was extracted from whole blood using *a commercial kit* (GE Healthcare Illustra Blood).

HLA Genotyping

HLA-class I and II genotyping were performed by the polymerase chain reaction amplification (PCR) technique using sequence of specific primers (One Lambda Inc., CA, UK).

Statistical analysis

The patients' data were analyzed by the software SPSS for Windows release 13™. The association between HLA alleles, different clinical features and gender were investigated using Fisher's exact test and Pearson's corrected chi-square test. P values ≤ 0.05 were considered significant after correction for the number of alleles with a frequency higher than 5% (non-rare allele). The delta method was used to estimate the variance of the prevalence ratio (PR).

Results

This series included 141 patients, 120 (85,1%) female and 21 (14,9%) male. Regarding clinical form, 47 (33,3%) dcSSc, 88 (62,4%) lcSSc and 6 (4,3%) sine scleroderma SSc patients.

We also classified patients based on the main antinuclear antibodies (ANA) patterns. Centromeric was present in 25 (17.7%), nucleolar in 23 (16.3%), other patterns in 61 (43.3%) and 32 (22.7%) had a negative ANA.

A confirmatory cardiac catheterism was performed in 14 of 19 patients diagnosed with PAH. The clinical features identified in this case series are listed on table 1.

There was no evidence of association between gender and any of the features considered (clinical forms, visceral involvement, ANA and HLA alleles).

We found no association of HLA alleles with the clinical forms of the disease (diffuse, limited and sine scleroderma) nor with the main patterns of ANA considered (centromeric and nucleolar).

Concerning the clinical manifestations, an evidence of association was found between PF and PAH ($p=0.017$).

GI involvement was not associated to HLA expression.

Pulmonary fibrosis: There was an association with class I HLA-A*30 ($p=0.020$) and class II DRB1*01 ($p=0.004$), DQB1*05 ($p<0.001$) e DQB1*04 ($p=0.019$). Tables 2 and 3) The HLA-A*30 and DQB1*04 alleles were more frequent in patients with PF and were related to a higher risk ($PR=1,86$ and $PR=1,70$, respectively). However, the HLA-DRB1*01 and DQB1*05 alleles appear to be protective ($PR=0,38$ and $PR=0,41$, respectively). (Table 4)

Pulmonary arterial hypertension: was related only to class I alleles B*35 ($p=0.035$), C*03 ($p=0.044$) e C*04 ($p=0.015$). (Tables 2 and 3) HLA-B*35 and C*04 alleles were more frequent, resulting in greater predisposition to this feature ($PR=2,58$ and $PR=2,71$, respectively). Nevertheless, C*03 allele was less frequent in these patients and was negatively correlated ($PR=0,13$). (Table 5)

Discussion

Our study investigated the frequencies of HLA class I and II alleles in unrelated ethnically Brazilian patients with SSc and their relationships with main clinical manifestations. It represents the first HLA genotyping study ever performed in our multiethnic population. Researches involving HLA and SSc are important in etiopathogenic point of view, and especially from a clinical perspective, in an attempt to identify patients with more severe disease.

In our series, there was no evidence of association between the clinical forms of the disease and HLA alleles. Our results did not support the previous reports of a higher skin score in the presence of HLA-B*62, DRB1*11 and DRB1*07 alleles. [4,9]

There are only few reports about relation between GI tract involvement and HLA alleles. We did not find any predisposing allele perhaps because of the high frequency of this feature, founded in almost 80% of the patients.

Concerning the clinical manifestations, we found an evidence of association between PF and PAH, determinants of poor prognosis.

Analysis including patients with PF revealed intriguing results. The previously described associations between PF and HLA-alleles are usually linked to ATA [10,30-32], but we did not consider autoantibodies profile. Cw*0602 and DR52a alleles were associated to PF [4,27], but in our study we did not identify these alleles as a risk factor. None of our patients presented these alleles. In our sample, both HLA-A*30 and DQB1*04 play a role in susceptibility to this manifestation. An interesting finding was the A*30 as a risk factor in PF and not in PAH as described by Gladman D. et al. [4] In addition, the presence of DRB1*01 and DQB1*05 alleles were negatively related to PF and considered protective.

Regarding PAH, we found higher risk in the presence of HLA-B*35 and C*04. HLA*B35 had already been described, and seem to be involved in the upregulation of ET-1 and the pathogenesis of PAH. [28,29] Gladman *et al.* found a significant association between PAH and HLA-A*30, B*13, B*65 and DRB1*03 alleles. [4] Our results did not confirm these findings. The frequency of these alleles in our sample was: A*30 in 15,8%, B*13 in 5,3%, DRB1*03 in 21% and no patient presented B*65. In this analysis, C*03 was noted as a protective allele, absent in all patients with PAH. We emphasize that C*04 and C*03 were not previously described to be related to PAH.

Our current study documents the association of some class I and II HLA alleles with the most severe clinical manifestations in a multiethnic case series. Our findings were not absolutely similar to the previous data in other populations. Based on these and previous results, it is clear that there are multiple genetic patterns in SSc, and various HLA alleles were associated with different clinical and serological aspects of the disease. In conclusion, new descriptive and multicentric genetic studies are necessary for a better comprehension and definition of the disease expression in Brazil.

References

1. H. Chiffhot, B. Fautzi, C. Sordet, E. Chatelus and J. Sibilia, Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review, *Semin Arthritis Rheum* **37** (2008), 223-235.
2. S. Bernatsky, L. Joseph, C.A. Pineau, P. Belisle, M. Hudson and A.E. Clarke, Scleroderma prevalence: Demographic variations in a population-based sample, *Arthritis Rheum* **61** (2009), 400-404.
3. V.D. Steen and T.A. Medsger, Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002, *Ann Rheum Dis* **66** (2007), 940-944.
4. D. Gladman, T. Kung, F. Siannis, F. Pellett, V.T. Farewell and P. Lee, HLA markers for susceptibility and expression in scleroderma, *J Rheumatol* **32** (2005), 1481-1487.
5. M. Kuwana, J. Kaburiaki, Y. Okano, H. Inoko and K. Tsuji, HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma), *J Clin Invest* **92** (1993), 1296-1301.
6. F.K. Tan, D.N. Stivers, F.C. Arnett, R. Chakraborty, R. Howard and J.D. Reveille, HLA haplotypes and microsatellite polymorphisms in and around the major histocompatibility complex region in a Native American population with a high prevalence of scleroderma, *Tissue Antigens* **53** (1999), 74-80.
7. J.D. Reveille, M. Fischbach, T. McNearney, A.W. Friedman, M.B. Aquilar, J. Lisse, M.J. Fritzler, C. Ahn and F.C. Arnett, Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic and immunogenetic determinants, *Semin Arthritis Rheum* **30** (2001), 332-346.
8. D. Frezza, V. Giambra, B. Tolusso, M. De Santis, S. Bosello, S. Vettori, G. Triolo, G. Valentini and G. Ferraccioli, Polymorphism of immunoglobulin enhancer element HS1,2A: allele *2 associates with systemic sclerosis. Comparison with HLA-DR and DQ allele frequency, *Ann Rheum Dis* **66** (2007), 1210-1215.
9. L.S. Loubiere, N.C. Lambert, M.M. Madeleine, A.J. Porter, M.E. Mullarkey, J.M. Panq, D.A. Galloway, D.E. Furst and J.L. Nelson, HLA allelic variants encoding DR11 in diffuse and limited systemic sclerosis in Caucasian women, *Rheumatology* **44** (2005), 318-322.
10. C.P. Simeón, V. Fonollosa, C. Tolosa, E. Palou, A. Selva, R. Solans, L. Armadans, E. Moreno, S. Marsal and M. Vilardell, Association of HLA Class II Genes with Systemic Sclerosis in Spanish Patients, *J Rheumatol* **36** (2009), 2733-2736

11. D.R. Karp, Novel sequence feature variant type analysis of the HLA genetic association in systemic sclerosis, *Human Molecular Genetics* **19** (2010), 707–719
12. L. Beretta, B. Rueda, M. Marchini, A. Santaniello, C.P. Simeón, V. Fonollosa, M. Caronni, R. Rios-Fernandez, P. Carreira, L. Rodriguez-Rodriguez; Spanish Systemic Sclerosis Group, A. Moreno, M.A. López-Nevot, A. Escalera, M.F. González-Escribano, J. Martin and R. Scorza, Analysis of Class II human leucocyte antigens in Italian and Spanish systemic sclerosis, *Rheumatology* **51** (2012), 52-59
13. F.C. Arnett, P. Gourh, S. Shete, C.W. Ahn, R.E. Honey, S.K. Agarwal, F.K. Tan, T. McNearney, M. Fischbach, M.J. Fritzler, M.D. Mayes and J.D. Reveille, Major Histocompatibility Complex (MHC) class II alleles, haplotypes, and epitopes which confer susceptibility or protection in the fibrosing autoimmune disease systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African–American and Hispanic cases and 1000 controls, *Ann Rheum Dis* **69** (2010), 822-827.
14. M. Kuwana, H. Inoko, H. Kameda, T. Nojima, S. Sato, K. Nakamura, T. Ogasawara, M. Hirakata, Y. Ohosone, J. Kaburaki, Y. Okano and T. Mimori, HLA class II genes associated with anticentromere antibody in Japanese patients with systemic sclerosis (scleroderma), *Ann Rheum Dis* **54** (1995), 983–987.
15. N.C. Lambert, O. Distler, U. Müller-Ladner, T.S. Tylee, D.E Furst and J.L. Nelson, HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men, *Arthritis Rheum* **43** (2000), 2005-2010.
16. T.R. Radstake, O. Gorlova, B. Rueda, J.E. Martin, B.Z. Alizadeh, R. Palomino-Morales, M.J. Coenen, M.C. Vonk, A.E. Voskuyl, A.J. Schuerwegh, J.C. Broen, P.L. van Riel, R. van 't Slot, A. Italiaander, R.A. Ophoff, G. Riemekasten, N. Hunzelmann, C.P. Simeon, N. Ortego-Centeno, M.A. González-Gay, M.F. González-Escribano; Spanish Scleroderma Group, P. Airo, J. van Laar, A. Herrick, J. Worthington, R. Hesselstrand, V. Smith, F. de Keyser, F. Houssiau, M.M. Chee, R. Madhok, P. Shiels, R. Westhovens, A. Kreuter, H. Kiener, E. de Baere, T. Witte, L. Padykov, L. Klareskog, L. Beretta, R. Scorza, B.A. Lie, A.M. Hoffmann-Vold, P. Carreira, J. Varga, M. Hinchcliff, P.K. Gregersen, A.T. Lee, J. Ying, Y. Han, S.F. Weng, C.I. Amos, F.M. Wigley, L. Hummers, J.L. Nelson, S.K. Agarwal, S. Assassi, P. Gourh, F.K. Tan, B.P. Koeleman, F.C. Arnett, J. Martin and M.D. Mayes, Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus, *Nat Genet* **42** (2010), 426-429.
17. X. Zhou, J.E. Lee, F.C. Arnett, M. Xiong, M.Y. Park, Y.K. Yoo, E.S. Shin, J.D. Reveille, M.D. Mayes, J.H. Kim, R. Song, J.Y. Choi, J.A. Park, Y.J. Lee, E.Y. Lee, Y.W. Song and E.B. Lee, HLA-DPB1 and DPB2 are genetic loci for systemic sclerosis: a genome-wide

association study in Koreans with replication in North Americans, *Arthritis Rheum* **60** (2009), 3807-3814.

18. J.D. Reveille, E. Durban, M.J. MacLeod-St Clair, R. Goldstein, R. Moreda, R.D. Altman and F.C. Arnett, Association of amino acid sequences in the HLA-DQB1 first domain with antitopoisomerase I autoantibody response in scleroderma (progressive systemic sclerosis), *J Clin Invest* **90** (1992), 973–980.

19. F.C. Arnett, J.D. Reveille, R. Goldstein, K.M. Pollard, K. Leaird, E.A. Smith, E.C. Leroy and M.J. Fritzler, Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis, *Arthritis Rheum* **39** (1996), 1151–1160.

20. J.D. Reveille, D. Owerbach, R. Goldstein, R. Moreda, R.A. Isern and F.C. Arnett, Association of polar aminoacids at position 26 of the HLA-DQB1 first domain with the anticentromere autoantibody response in systemic sclerosis (scleroderma), *J Clin Invest* **89** (1992), 1208–1213.

21. C. Marguerie, C.C. Bunn, J. Copier, R.M. Bernstein, J.M. Gilroy, C.M. Black, A.K. So and M.J. Walport, The clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to the nucleolar antigen PM-Scl. *Medicine (Baltimore)* **71** (1992), 327–336.

22. P.A. Morel, H.J. Chang, J.W. Wilson, C. Conte, S.L. Saidman, J.D. Bray, D.J. Tweardy and T.A. Medsger Jr., Severe systemic sclerosis with antitopoisomerase I antibodies is associated with an HLA-DRw11 allele, *Hum Immunol* **40** (1994), 101–110.

23. D. Briggs, C. Stephens, R. Vaughan, K. Welsh and C. Black, A molecular and serologic analysis of the major histocompatibility complex and complement component C4 in systemic sclerosis, *Arthritis Rheum* **36** (1993), 943-955.

24. G.C. Fanning, K.I. Welsh, C. Bunn, R. Du Bois and C.M. Black, HLA associations in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients, *Br J Rheumatol* **37** (1998), 201-207.

25. J.D. Reveille, M. Fischbac, T. McNearney, A.W. Friedman, M.B. Aguilar, J. Lisse, M.J. Fritzler, C. Ahn and F.C. Arnett, GENISOS Study Group, Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic and immunogenetic determinants, *Semin Arthritis Rheum* **30** (2001), 332-346.

26. M. Kuwana, J. Kaburaki, Y. Okano, H. Inoko and K. Tsuji, The HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma), *J Clin Invest* **92** (1993), 1296-1301.

27. P. Langevitz, D. Buskila, D.D. Gladman, G.A. Darlington, V.T. Farewell and P. Lee, HLA alleles in systemic sclerosis: association with pulmonary arterial hypertension and outcome, *Br J Rheumatol* **31** (1992), 609-613.
28. A. Santaniello, G. Salazar, S. Lenna, R. Antonioli, G. Colombo, L. Beretta and R. Scorza, HLA-B35 upregulates the production of endothelin-1 in HLA-transfected cells: a possible pathogenetic role in pulmonary hypertension, *Tissue Antigens* **68** (2006), 239-244.
29. S. Lenna, D.M. Townsend, F.K. Tan, B. Kapanadze, M. Markiewicz, M. Trojanowska and R. Scorza, HLA-B35 upregulates endothelin-1 and downregulates endothelial nitric oxide synthase via endoplasmic reticulum stress response in endothelial cells, *J Immunol* **184** (2010), 4654-4661.
30. F.C. Arnett, HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis), *Int Rev Immunol* **12** (1995), 107-128.
31. J. Whyte, C. Artlett, G. Harvey, C.O. Stephens, K. Welsh, C. Black, P.J. Maddison and N.J. McHugh, HLA-DQB1 associations with anti-topoisomerase-1 antibodies in patients with systemic sclerosis and their first degree relatives. United Kingdom Systemic Sclerosis Study Group, *J. Autoimmun* **7** (1994), 509-520.
32. F.C. Gilchrist, C. Bunn, P.J. Foley, P.A. Lympany, C.M. Black, K.I. Welsh and R.M. du Bois, Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP, *Genes Immun* **2** (2001), 76-81.
33. E.C. LeRoy, C. Black, R. Fleischmajer, S. Jablonska, T. Krieg, T.A. Medsger Jr, N. Rowell and F. Wollheim, Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis, *J Rheumatol* **15** (1988), 202-5.
34. H. Poormoghim, M. Lucas, N. Fertig, T.A. Medsger Jr., Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic factors and survival in forty-eight patients, *Arthritis Rheum* **43** (2000), 444-451.
35. A. Ramirez and J. Varga, Pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: clinical manifestations, pathophysiology, evaluation, and management, *Treat Respir Med* **3** (2004), 339-352.
36. N.K. Harrison, A.R. Myers, B. Corrin, G. Soosay, A. Dewar, C.M. Black, R.M. Du Bois and M. Turner-Warwick, Structural features of interstitial lung disease in systemic sclerosis, *Am Rev Respir Dis* **144** (1991), 706-713.

Table 1. Characteristics of study case series

	N	%
Gender F:M	120:21	
Diffuse disease	47	(33,3)
Limited disease	88	(62,4)
Sine scleroderma	6	(4,3)
Pulmonary fibrosis	61	(43,3)
Pulmonary arterial hypertension	19	(13,5)
Gastrointestinal involvement	112	(79,4)
ANA	109	(77,3)

Table 2. Class I HLA alleles frequency in pulmonary fibrosis (PF) and pulmonary arterial hypertension (PAH)

HLA	PF			PAH		
	N=61	(%)	p	N=19	(%)	p
A*01	13	(21,3)	0,866	4	(21,0)	1
A*02	24	(39,3)	0,208	7	(36,8)	0,421
A*03	12	(19,6)	0,163	5	(26,3)	1
A*33	5	(8,2)	0,746	1	(5,3)	1
A*23	6	(9,8)	0,622	2	(10,6)	0,665
A*11	7	(11,5)	0,271	3	(15,8)	0,207
A*29	6	(9,8)	0,974	2	(10,6)	1
A*30	9	(14,7)	0,020	3	(15,8)	0,207
A*24	9	(14,7)	0,968	1	(5,3)	0,307
A*68	7	(11,5)	0,967	0	(0)	0,129
B*15	9	(14,7)	0,390	1	(5,3)	0,469
B*07	6	(9,8)	0,269	3	(15,8)	0,722
B*44	9	(14,7)	0,532	2	(10,6)	0,53
B*18	12	(19,6)	0,598	5	(26,3)	0,333
B*35	13	(21,3)	0,866	8	(42,1)	0,035
B*39	5	(8,2)	0,548	2	(10,6)	1
B*51	7	(11,5)	0,592	4	(21,0)	0,098
B*08	8	(13,1)	0,269	2	(10,6)	1
B*14	6	(9,8)	0,621	3	(15,8)	0,454
C*03	8	(13,1)	0,477	0	(0)	0,044
C*06	14	(22,9)	0,950	4	(21,0)	1
C*07	28	(46,0)	0,581	10	(52,6)	0,376
C*04	19	(31,1)	0,637	10	(52,6)	0,015
C*05	4	(6,6)	0,170	3	(15,8)	0,428
C*12	7	(11,5)	0,544	1	(5,3)	0,47
C*08	5	(8,2)	0,303	3	(15,8)	0,454
C*02	4	(6,6)	0,242	1	(5,3)	0,693

*Univariate p values calculated with Qui-squares and Fisher's exact tests where appropriate

Table 3. Class II HLA alleles frequency in pulmonary fibrosis (PF) and pulmonary arterial hypertension (PAH)

HLA	PF			PAH		
	N=61	(%)	p	N=19	(%)	p
DRB1*01	5	(8,2)	0,004	4	(21,0)	0,761
DRB1*04	14	(22,9)	0,95	5	(26,3)	0,769
DRB1*16	3	(4,9)	0,35	0	(0)	0,36
DRB1*11	24	(39,3)	0,186	7	(36,8)	0,727
DRB1*10	1	(1,6)	*	0	(0)	0,594
DRB1*13	10	(16,4)	0,086	5	(26,3)	0,773
DRB1*08	10	(16,4)	0,099	3	(15,8)	0,454
DRB1*15	14	(22,9)	0,671	3	(15,8)	0,764
DRB1*03	14	(22,9)	0,809	4	(21,0)	1
DRB1*07	9	(14,7)	0,968	1	(5,3)	0,307
DRB1*09	3	(4,9)	*	1	(5,3)	*
DRB1*12	3	(4,9)	*	1	(5,3)	*
DRB1*14	2	(3,3)	*	0	(0)	*
DRB5	13	(21,3)	0,866	2	(10,6)	0,246
DRB5*01	4	(6,6)	*	1	(5,3)	1
DRB3	11	(18,0)	0,361	2	(10,6)	0,739
DRB3*01	2	(3,3)	0,299	0	(0)	0,69
DRB3*02	28	(46,0)	0,915	10	(52,6)	0,496
DRB4	3	(4,9)	*	1	(5,3)	*
DRB4*01	22	(36,0)	0,744	5	(26,3)	0,275
DQB1*03	34	(55,8)	0,93	11 (57,9)		0,808
DQB1*05	11	(18,0)	<0,001	4	(21,0)	0,178
DQB1*06	23	(37,7)	0,782	7	(36,8)	0,835
DQB1*02	19	(31,1)	0,883	4	(21,0)	0,336
DQB1*04	14	(22,9)	0,019	5	(26,3)	0,163

*Univariate p values calculated with Qui-squares and Fisher's exact tests where appropriate; NC=non-calculable

Table 4. Risk and protective alleles for pulmonary fibrosis

PF related alleles	PR	(95% CI)	p*
HLA-A*30	1.86	(1.26 to 2.74)	0.020
HLA-DQB1*04	1.70	(1.17 to 2.48)	0.019
HLA-DQB1*05	0.41	(0.24 to 0.72)	<0.001
HLA-DRB1*01	0.38	(0.17 to 0.85)	0.004

95% CI = 95% confidence intervals; PR = prevalence ratio; *Univariate p values calculated with Qui-squares and Fisher's exact tests where appropriate

Table 5. Risk and protective alleles for pulmonary arterial hypertension

PAH related alleles	PR	(95% CI)	p*
HLA-B*35	2.58	(1.14 to 5.85)	0.035
HLA-C*04	2.71	(1.19 to 6.18)	0.015
HLA-C*03	0.13	(0.01 to 2.14)	0.044

95% CI = 95% confidence intervals; PR = prevalence ratio; *Univariate p values calculated with Qui-squares and Fisher's exact tests where appropriate

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo sobre esclerose sistêmica (esclerodermia). Esta folha de informação tem por objetivo fornecer - lhe maiores detalhes sobre este estudo, de tal forma que você possa decidir se deseja ou não participar do mesmo. Este trabalho tem como intenção estudar os pacientes com esclerose sistêmica. É importante que você compreenda que há riscos mínimos envolvendo este estudo, pois se trata apenas da coleta de sangue para ver se ele tem uma parte que causa a doença e o único desconforto será a picada da agulha para se coletar o sangue. Os resultados obtidos na pesquisa serão mantidos em segredo e o sangue será utilizado apenas para este estudo. Se acaso surgir outro estudo onde poderemos usar o mesmo sangue entraremos em contato com o Comitê de Ética para solicitar uma nova aprovação. O benefício que este estudo trará para o paciente será a oportunidade de ajudar no melhor entendimento da doença. Os resultados obtidos ficarão a disposição do paciente em seu prontuário. Não haverá ajuda financeira para alimentação/ transporte, pois os dados dos pacientes e a coleta de sangue serão realizados durante as consultas de rotina agendadas para o paciente no ambulatório de Reumatologia. O armazenamento do sangue será feito em freezer a -20°C localizado no Laboratório de Reumatologia/ Departamento de Clínica-Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

PROCEDIMENTO DE ESTUDO

Para participar do estudo, você deve estar disposto a deixar realizar a coleta de sangue (2 amostras num total de 4,5 ml para cada amostra). Caso você tenha dúvidas ou perguntas referentes a esta avaliação, sempre poderá consultar o médico responsável pela pesquisa, mesmo após iniciado o estudo, você poderá desistir dele em qualquer período sem prejuízo no seu tratamento.

TERMO DE PARTICIPAÇÃO E ASSINATURAS

Pesquisa: **Frequência do HLA classe I e II na pneumopatia intersticial e na hipertensão arterial pulmonar em pacientes com esclerose sistêmica**

Responsáveis: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo/ Dra Ana Paula T Del Rio

Dados do paciente

Nome -
Data de Nascimento - RG -
Idade -
Endereço -
Telefone - HC -

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente desta pesquisa para ver se meu sangue contém alguma parte ligada à doença em questão. Estou informado que para participar deste estudo terei que colher 2 amostras de sangue, num total de 4,5ml para cada amostra. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento. Eu li /ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre minhas dúvidas oralmente. Entendi a intenção do estudo, os mínimos riscos a que estarei exposto, bem como os benefícios da minha aceitação em participar do mesmo. A minha assinatura, a seguir, indica que concordei em participar voluntariamente do estudo.

Data Assinatura

Em relação ao armazenamento do meu sangue:

() aceito que o sangue seja armazenado () não aceito que o sangue seja armazenado

Em relação a novos estudos:

() aceito que meu sangue seja utilizado novamente () não aceito que seja utilizado novamente

Eu, abaixo assinado, expliquei e discuti todos os detalhes importantes deste estudo, usando uma linguagem compreensível e apropriada e acredito que o voluntário tenha entendido a explicação.

Dra Ana Paula Toledo Del Rio
Fone (019) 35217776 (Ambulatório de Reumatologia)
Dúvidas: Comitê de Ética (19) 35218936