

FABIANA POMPÊO DE PINA

**ARTRITE REUMATÓIDE EM AFRO-BRASILEIROS:
“O PAPEL DO HLA”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. MANOEL BARROS BÉRTOLO

CAMPINAS
2009

Artrite Reumatóide em Afro-Brasileiros: “*O Papel do HLA*”.

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica
Área Clínica Médica
Dissertação de Mestrado**

**Orientador: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas**

**CAMPINAS
Universidade Estadual de Campinas
2009**

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

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

P65a Pina, Fabiana Pompêo de
Artrite Reumatóide em Afro-brasileiros: “O papel do HLA” /
Fabiana Pompêo de Pina. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Artrite reumatóide. 2. Artrite. 3. Antígenos de
histocompatibilidade HLA. 4. Negros – Brasil. 5. Etnia. 6.
Doenças crônicas. I. Bértolo, Manoel Barros. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Rheumatoid arthritis in Afro-brazilians: “ The role of HLA”

Keywords: • Rheumaoid arthritis

- Arthritis
- Histocompatibility antigens, HLA
- African Continental Ancestry Group, Brazil
- Etnic

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo
Prof. Dr. João Francisco Marques Neto
Prof. Dr. José Roberto Provenza

Data da defesa: 24-04-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Fabiana Pompêo de Pina

Orientador: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

Membros:

1. Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

2. Prof. Dr. João Francisco Marques Neto

3. Prof. Dr. José Roberto Provenza

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Manoel Barros Bértolo, is written over the list of members. The signature is highly cursive and overlaps the text of the first two members.

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

Data: 24/04/2009

***Aos meus pais, Dalton e Madalena.
À Deus.***

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo, pelo apoio, incentivo, colaboração, disponibilidade, otimismo, amizade e, sobretudo, paciência.

Ao Prof. Dr. Paulo Louzada Junior pelo apoio, colaboração, ensinamentos e valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Francisco Marques Neto, grande responsável pela minha formação profissional, pelo estímulo constante, oportunidades concedidas, confiança e amizade.

Ao Prof. Rubens Bonfiglioli, grande responsável pela minha escolha e formação profissional, pelo incentivo constante, amizade sincera e confiança.

Ao Prof. Dr. José Roberto Provenza, grande responsável pela minha formação profissional, pelo carinho, ensinamentos éticos, confiança e amizade.

Ao Prof. Ms. José Alexandre Mendonça, grande amigo, pelo incentivo e disponibilidade constante.

À Dra. Roseneide Aparecida Conde que, com paciência e carinho me recebeu, ensinou e orientou no Laboratório de Histocompatibilidade

Ao Prof. Dr. Nilzio Antônio da Silva, por ter carinhosamente me acolhido, por seus ensinamentos constantes e confiança.

Ao Prof. Dr. Adil Muhib Samara, pelo respeito, ensinamentos e oportunidades concedidas.

Ao Prof. Ibsem Bellini Coimbra, pelo incentivo, interesse constante e lição de vida.

*“Todo conhecimento inicia-se na imaginação,
no sonho; só depois desce à realidade material
e terrena por meio da lógica”*

- ALBERT EINSTEIN -

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Considerações Gerais.....	14
1.2 Imunopatogênese.....	15
1.3 Marcadores Prognósticos da AR.....	16
1.4 Sistema HLA.....	16
1.5 HLA e Artrite Reumatóide.....	20
1.6 A miscigenação.....	23
1.7 Afro-Brasileiros.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	27
3.1 Critérios de Inclusão.....	27
3.2 Critérios de Exclusão.....	27
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	28
4.1 Casuística.....	28
4.1.1 Pacientes.....	28
4.1.2 Controles.....	28
4.1.3 Critérios Clínicos.....	28
4.1.4 Exames subsidiários.....	29
4.1.5 Critérios diagnósticos de Artrite Reumatóide pelo ACR.....	29
4.2 Métodos.....	29
4.2.1 Análise Molecular.....	29
4.2.1.1 Extração de DNA.....	29
4.2.1.2 Tipagem e subtipagem dos alelos HLA-DR.....	30

4.2.2 Agrupamento dos alelos de acordo com os modelos de epitopo Semelhante(SE) e de proteção da Artrite Reumatóide.....	31
4.2.3 Método Estatístico.....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Características clínicas e epidemiológicas.....	33
5.2 Alelos HLA.....	34
5.3 Distribuição dos alelos HLA-DRB1.....	35
5.4 Alelos DERAA-positivos (RAP Model) e a influência do epitopo semelhante	38
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Figura 1. O cromossomo 6.....	19
Figura 2. Regiões cromossômicas do complexo HLA.....	20
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 2% da amplificação do DNA de 72 pacientes e 75 controles afro-brasileiros.....	35
Gráfico 1. Frequência dos alelos HLA-DRB1*0404 em pacientes e controles	36
Gráfico 2. Frequência dos alelos HLA-DRB1*0405 em pacientes e controles.....	36
Gráfico 3. Frequência dos alelos HLA-DRB1*0102 em pacientes e controles.....	37
Gráfico 4. Frequência de epitopos semelhantes (SE) em pacientes afro-brasileiros.....	37
Quadro 1. Critérios Diagnósticos de Artrite Reumatóide pelo ACR.....	29
Quadro 2. Agrupamento de alelos de acordo com modelos do epitopo semelhante (SE) e RAP Model (DERAA).....	32
Tabela 1. Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes afro-brasileiros	33
Tabela 2. Manifestações extra-articulares em 72 pacientes afro-brasileiros com AR.....	34
Tabela 3. Subtipagem dos antígenos HLA-DRB1.....	38
Tabela 4. Frequência dos genótipos DRB1 de acordo com a presença de alelos predisponentes(epitopo semelhante) e alelos protetores (DERAA) em pacientes afro-brasileiros com Artrite Reumatóide e controles.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	College of Rheumatology
AGS	Avaliação do Estado Geral de Saúde
AR	Artrite Reumatóide
BBC	British Broadcasting Corporation
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DAS28	Disease Activity Score 28
EVA	Escala Visual Analógica
F	Feminino
FR	Fator Reumatóide
FCM	Faculdade e Ciências Médicas
H	hora
HAQ	Health Assessment Questionnaire
HC	Hospital das Clínicas
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucinas
INF-G	Intérferon gama
In	logaritmo neperiano
M	Masculino
ml	mililitro
mm	milímetro
NAD	Número de Articulações Doloras
NAE	Número de Articulações Edemaciadas
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase
rpm	rotações por minuto
SE	Shared Epitope
TCR	Receptores de células T
ul	microlitro

UNICAMP Universidade Estadual de Campinas

VHS Velocidade de Hemossedimentação

°C Graus Celsius

RESUMO

A associação de antígenos de histocompatibilidade com a Artrite Reumatóide (AR) vem sendo demonstrada em inúmeros estudos. No entanto, a avaliação em populações afro-descendentes ainda foi pouco estudada. Os propósitos deste estudo foram os de determinar a freqüência dos alelos HLA-DRB1 e as contribuições do polimorfismo desses alelos na susceptibilidade da AR na população afro-brasileira. Este estudo avaliou também, se a teoria do epitopo semelhante (SE) e o modelo de proteção da Artrite Reumatóide (RAP Model) se aplicam aos pacientes afro-brasileiros com AR. Os alelos HLA-DRB1 de 72 pacientes afro-brasileiros com AR, diagnosticados pelos critérios do American College of Rheumatology (ACR), e de 75 indivíduos saudáveis foram tipados e subtipados utilizando-se a técnica de reação em cadeia de polimerase de DNA amplificado hibridizado, com seqüência de primers específicos de alta e baixa resolução, e depois comparados. Os alelos HLA-DRB1 *0404 e *0405 apresentaram freqüência maior nos pacientes do que no grupo controle. Já, alelo HLA-DRB1*0102 apresentou uma freqüência aumentada no grupo controle (9,3%), quando comparada com a freqüência nos pacientes. Os alelos DRB1 considerados como pertencentes ao grupo do epitopo semelhante estavam presentes em 39 pacientes (54,2%) e em 20 controles (26,7%), indicando que teoria do epitopo semelhante se aplica à população afro-brasileira com Artrite Reumatóide. Os alelos HLA-DRB1 que apresentavam a seqüência DERAA (alelos protetores) reduziram, de forma independente, o risco de desenvolver AR. Os dados obtidos apontam para uma intensa miscigenação racial presente no Brasil. Assim, como nos faz concluir que a susceptibilidade da Artrite Reumatóide em afro-brasileiros é, provavelmente, mediada pela interação de fatores genéticos e étnicos.

ABSTRACT

The association of histocompatibility antigens with Rheumatoid Arthritis (RA) comes being demonstrated in innumerable studies. However, the evaluation in afro-descendents populations still little was studied. The aim of this study has been to determine the frequency of HLA-DRB1 alleles, and the contributions of the polymorphism of these alleles in the susceptibility of RA in the Afro-Brazilian population as well. This study, also evaluated, if the theory of the shared epitope(SE) and the model of protection of the Rheumatoid Arthritis (RAP Model) can also be applied to the Afro-Brazilian patients suffering RA. The HLA-DRB1 alleles in 72 Afro-Brazilian patients suffering RA, diagnosed in accordance to the criteria of the American College of Rheumatology (ACR), and of 75 healthful volunteers had been typed and sub-typed using the technique of the polymerase chain reaction of the amplified hybridized DNA, with specific sequence of primers of high and low resolution, were then compared. The HLA-DRB1 *0404 and *0405 alleles had presented higher frequency in the patients group than in the control group. The HLA-DRB1 *0102 alleles presented a frequency increased (9,3%) in the control group, when compared with the patients group. The DRB1 alleles considered as pertaining to the group of shared epitope were present in 39 patients (54.2%) and in 20 members of the control group(26.7%), indicating that the theory of the shared epitope it is also applied to the Afro-Brazilian population with Rheumatoid Arthritis. The HLA-DRB1 alleles that presented DERA sequence (protectors alleles), had reduced, of independent form, the risk to develop RA. The gotten data point to an intense racial miscegenation in Brazil. Thus, as in it makes them to conclude that the susceptibility of the Rheumatic Arthritis in Afro-Brazilian is, probably, determined by the interaction of genetic and ethnic factors.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Artrite Reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica, sistêmica, de etiologia desconhecida, que leva a uma poliartrite, resultando em dano à cartilagem e áreas vizinhas ao osso. Por sua característica crônica e progressiva, tende a evoluir para deformidades articulares, com perda funcional em poucos anos.

A prevalência da AR em estudos epidemiológicos realizados no exterior, varia entre 1 e 6%. (Alarcon, 1995). No Brasil, um estudo multicêntrico em macrorregiões do país encontrou uma prevalência de AR em adultos de 0,2 a 1,0% da população (Marques Neto et al, 1993). A incidência da doença é ao redor de 26 casos/10.000 habitantes (Chan et al, 1993). Pode ocorrer em qualquer idade, com o pico entre a 4ª e 6ª décadas. As mulheres são afetadas duas ou três vezes mais que os homens (Zuaifler, 1989; Schaardenburg, 1994).

Embora a doença seja ainda de causa desconhecida, avanços significantes têm sido feitos no esclarecimento da patogênese da AR. Há, certamente, fatores desencadeantes dos processos imunológico e inflamatório e uma evidente participação genética, que têm sido avaliados através de estudos de imunogenética e biologia molecular (Klareskog, Ronnelid, Holm, 1995).

Vírus e bactérias, há longo tempo, têm sido suspeitos de desencadarem o processo da AR. Numerosos patógenos como: *mycoplasma*, *proteus*, *clostridium*, retrovírus e o vírus do Epstein-Barr têm sido relacionados à patogenia da AR. Se um agente infeccioso tem um papel etiológico, um grande número de diferentes agentes pode estar envolvido, atuando como um estímulo não específico junto a outro fator predisponente (Rook, 1993).

Estudos em populações e famílias estabeleceram uma importante contribuição dos fatores genéticos na susceptibilidade da AR e na progressão da doença (Ollier et al, 1992).

Dois marcadores têm sido claramente associados com a AR: o fator reumatóide (FR) e o sistema antígeno leucocitário humano (HLA). Os pacientes com Artrite Reumatóide têm uma freqüência maior do FR e do antígeno HLA-DR4, quando comparados com grupo controle (Jaraquemada et al, 1986).

O fato das mulheres apresentarem maior incidência de AR que os homens, principalmente antes da menopausa, levou à hipótese de um envolvimento hormonal na doença, embora o papel dos hormônios sexuais no desencadeamento desta enfermidade ainda não esteja bem estabelecido. O hipoandrogenismo pode ser a causa do predomínio da doença em mulheres adultas jovens (Masi et al, 1995). A participação dos hormônios sexuais na AR é reforçada, principalmente, com a melhora da atividade da doença durante a gravidez (Cecere e Perselini, 1981) e com o efeito protetor dos contraceptivos orais na ocorrência da doença (Spector e Hochberg, 1990; Hannaford et al, 1990).

1.2 Imunopatogênese

A membrana sinovial na AR apresenta-se com intensa proliferação, sendo composta por células análogas aos fibroblastos e vasos sanguíneos neoformados. Os estágios iniciais da AR caracterizam-se por infiltração de células inflamatórias, aumento da expressão de antígenos HLA classe II (DR) e marcada neovascularização, enquanto nos estágios tardios ocorre fibrose do tecido sinovial (Klareskog et al., 1981). As células inflamatórias e os macrófagos movimentam-se continuamente, dos capilares venosos para a camada de revestimento, levando ao desenvolvimento de uma subcamada de revestimento da sinóvia inflamada, composta de uma população de células análogas aos macrófagos (Harris, 1990).

Em estudos de membrana sinovial reumatóide, foi demonstrada a presença de citocinas, tais como: interferon gama (INF-G), e interleucinas (IL) IL1, IL2, IL4, IL10 e IL12, liberadas por linfócitos T (Ulfgren et al., 1995). Trabalhos com artrite induzida por colágeno em camundongos (Holmdahl et al., 1986) e ratos (Klareskog et al., 1983), demonstraram que a artrite é dependente de linfócitos T, podendo, em certos estágios da doença, ser prevenida e tratada com agentes que alteram estes linfócitos.

Acredita-se que a AR seja iniciada por um patógeno não especificado, que provoca uma resposta imune mediada pelos linfócitos T do hospedeiro. Em certos indivíduos, geneticamente predispostos, a resposta ao patógeno tem reação cruzada com antígenos próprios das articulações. Assim, tem início uma resposta auto-

imune, mediada por células T, contra os tecidos do hospedeiro. Mesmo com ausência da exposição ao patógeno, os linfócitos T continuarão a responder aos antígenos próprios, o que perpetua o processo inflamatório (Gregersen, 1992).

O reconhecimento imunológico pelas células T requer formação do complexo trimolecular, constituído pelos receptores das células T (TCR), moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) e peptídeos antigênicos (Germain, 1994). A molécula HLA-DR associada à AR liga-se, seletivamente, a partículas de antígenos, e o reconhecimento do complexo peptídeo-moléculas do CPH, pelas células T CD4+, é realizado pelas especificidades dos receptores das células T, que iniciam e mantêm a inflamação na sinóvia (Todd et al., 1988).

1.3 Marcadores Prognósticos da Artrite Reumatóide

O prognóstico da Artrite Reumatóide não é uniforme pois os pacientes apresentam subgrupos com evolução variável (Picus e Callahan, 1993) e poucos são os marcadores prognósticos que permitem uma estratificação dos pacientes (Gordon, Stein, Broder, 1973). Os fatores genéticos têm atraído muita atenção neste sentido. O HLA-DR4, por exemplo, foi associado em estudos a alterações destrutivas coxofemorais e dos ombros e à presença de nódulos subcutâneos (Paulus e Bulpitt, 1995), e em alguns estudos, à presença de fator reumatóide (Oslen et al, 1988).

1.4 Sistema HLA

O sistema HLA é o mais polimórfico descrito no homem. O interesse pelo seu estudo deve-se ao fato de que numerosas doenças apresentam associação com os antígenos deste sistema. Ele consiste em um conjunto de aloantígenos, cuja importância foi inicialmente reconhecida no campo dos transplantes de tecidos e órgãos. Os genes responsáveis pela codificação dos antígenos HLA localizam-se na região HLA, que corresponde a um pequeno segmento cromossômico, no braço curto do cromossomo 6 humano (Figura 1). Os genes HLA se subdividem em classe

I (A, B, C) e classe II (DR, DQ, DP). Os genes HLA classe I e II codificam para glicoproteínas de superfície celular que correspondem aos antígenos HLA classe I (A, B e C) e classe II (DR, DQ e DP), respectivamente. A organização desses genes está representada na Figura 2 (Campbell, 1993). As moléculas de HLA classe I estão presentes em praticamente todas as células nucleadas do organismo. As moléculas de HLA classe II são encontradas principalmente em células imunocompetentes, linfócitos B, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T ativados (Strachan, 1987).

As moléculas de classe II são um heterodímero constituído por duas cadeias glicoprotéicas; alfa (34.000 daltons) e beta (29.000 daltons), em associação não covalente. As cadeias alfa e beta são compostas de 229 a 237 aminoácidos respectivamente, e são formadas por três regiões: uma região extracelular hidrofílica, uma transmembrana hidrófoba e uma intracelular hidrofílica. A região hidrofílica extracelular da cadeia alfa contém dois domínios (resíduos 1 a 84 e 85 a 178), designados de alfa1 e alfa2, respectivamente. A região hidrofílica de cadeia beta também contém dois domínios (resíduos 1 a 91 e 92 a 192) designados de beta1 e beta2, respectivamente (Brodsky et al.,1996).

As moléculas do HLA de classe II têm um papel central na resposta imune por apresentarem fragmentos de antígenos para os linfócitos T-CD4 (Zaleski,1991). Citocinas podem induzir as moléculas de classe II a expressarem-se em uma variedade de células, conferindo a estas últimas, capacidade de apresentarem antígenos para linfócitos T-CD4. Através deste mecanismo, as moléculas de classe II apresentam determinados peptídeos para as células T, que são reconhecidos pelo receptores das células T-CD4, o que ativa as células B. As moléculas de classe II são, portanto, produtos dos genes da resposta imune e possuem um vasto polimorfismo (Janeway e Travers, 1994).

Cada locus HLA (A,B,C, DR, DQ e DP), assim como aqueles que codificam para fatores do complemento (C2, C4A, C4B e BF) podem ser ocupados por uma série de genes alternativos que constituem as séries alélicas. A enumeração dos antígenos HLA, presentes em um indivíduo, constitui o fenótipo HLA. O conjunto de genes presentes na região HLA e carregados por um cromossomo é denominado haplótipo. O conjunto de haplótipos materno e paterno constitui o genótipo HLA (Bodmer et al.,1995).

O polimorfismo do sistema HLA foi inicialmente detectado usando-se métodos celulares e sorológicos, que se tornaram limitados após a determinação das sequências de nucleotídeos de muitos alelos deste sistema. A comparação das sequências de todos os alelos conhecidos mostra que, aqueles associados com uma especificidade sorológica em particular, frequentemente contêm um ou mais resíduos de aminoácidos que não estão presentes em outras especificidades. Provavelmente, estes resíduos formam epítomos que são reconhecidos por diferentes reagentes sorológicos.

As limitações das tipagens celular e sorológica estimularam o desenvolvimento de métodos de genotipagem, que se tornaram ainda mais vantajosos com o emprego da reação da cadeia de polimerase (PCR). Esta reação amplifica seletivamente e em poucas horas, um trecho de DNA e, a seguir, há hibridização com um painel de sondas que detecta sequências polimórficas que, por sua vez, distinguem um alelo ou grupo de alelos de outros grupos (Wordsworth et al., 1990; Andrade, 1993; Bidwell, 1994).

A nomenclatura dos alelos HLA, determinados por método molecular, é designada pelo Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde (OMS), para o sistema HLA e está sob constante atualização. Consiste do locus seguido por um asterisco e um número de quatro ou cinco dígitos. Os dois primeiros dígitos indicam a especificidade sorológica, os dois dígitos seguintes, os alelos, e o quinto número é usado para indicar mutações. Exemplificando, o alelo HLA-DRB1*0401 pertence ao locus HLA-DRB1 e está associado à especificidade sorológica HLA-DR4.

Figura 1: O cromossomo 6.

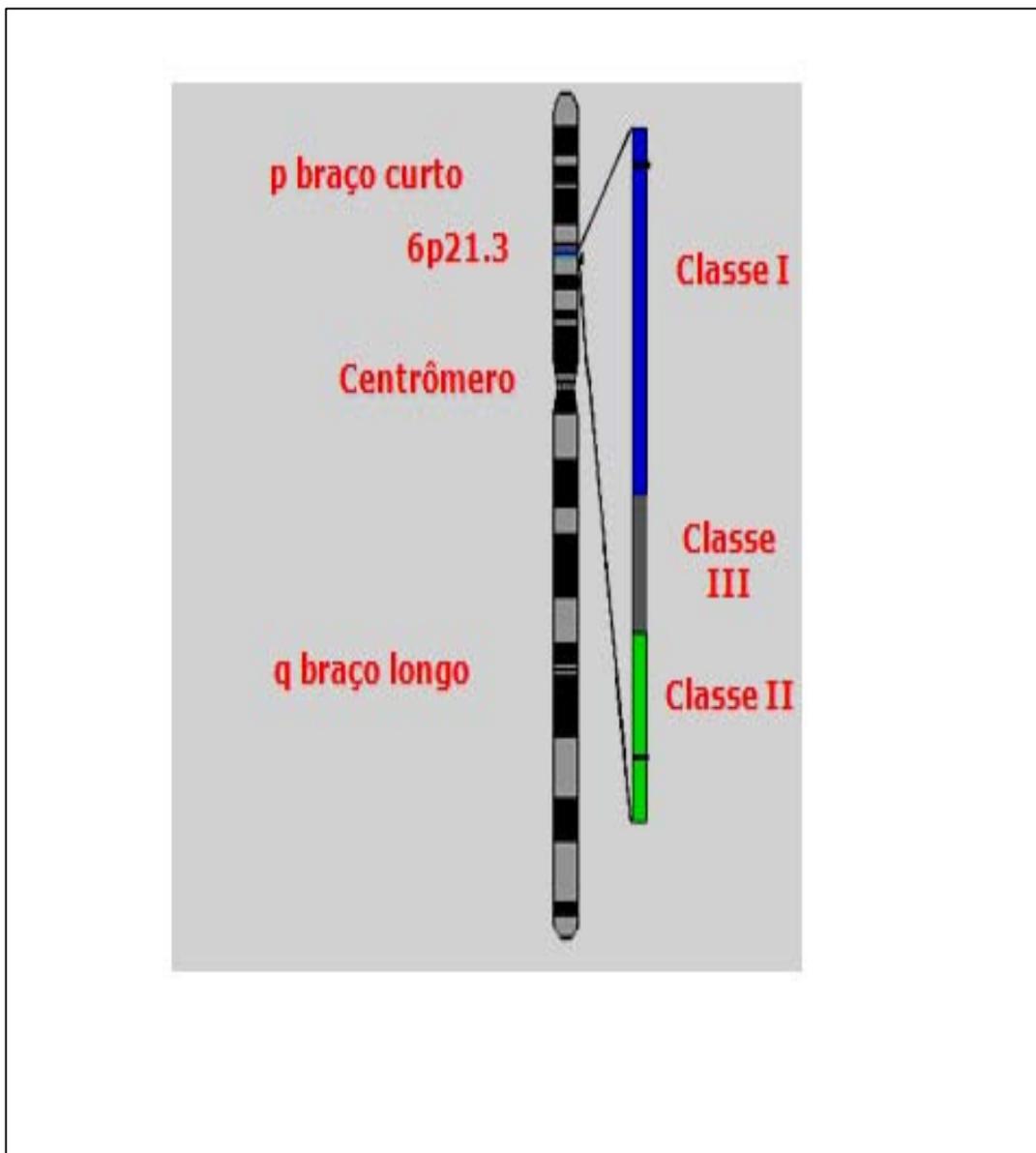
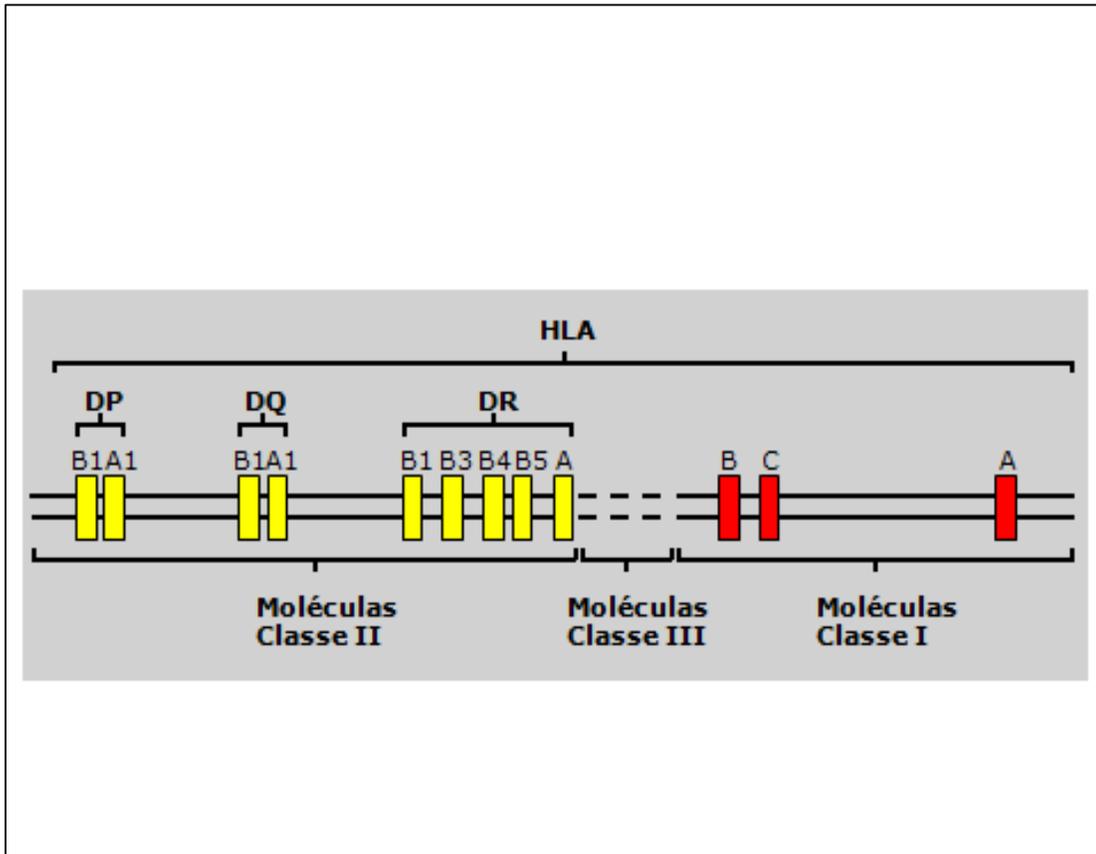


Figura 2: Regiões cromossômicas do complexo HLA



1.5 HLA e Artrite Reumatóide

A demonstração na década de 60, de que a susceptibilidade a certas leucemias em camundongos era controlada por genes CPH, inspirou a realização de estudos, no homem, sobre associação entre doenças e antígenos HLA. As doenças associadas a antígenos do sistema HLA possuem várias características comuns, tais como, causa e padrão de distribuição hereditário.

O polimorfismo alélico das moléculas de classe I e II determina quais peptídeos podem unir-se ao sítio de ligação do sistema HLA e então, serem apresentados aos linfócitos T. Desta forma, apenas peptídeos contendo aminoácidos de tamanho e carga apropriados podem ser acomodados. Apesar

dessas restrições, o número de peptídeos que pode estar ligado e apresentado por algum alelo particular do antígeno HLA, é muito grande. Portanto, a diversidade dos genes HLA e o polimorfismo alélico e heterozigótico, em muitas populações humanas, resultam em um extraordinário repertório de respostas imunes.

A associação de certas doenças com os antígenos HLA também está relacionada com os polimorfismos de certos alelos ou sequências específicas de aminoácidos, os quais podem ser semelhantes em um grande número de alelos (hipótese do epitopo semelhante). Devido a este polimorfismo no sítio de ligação do antígeno, os alelos HLA, associados a doenças, ligam-se aos peptídeos auto-antigênicos, apresentando-os às células T. (Harris, 1990; Woulfe, 1995).

Stastny inicialmente reportou um significativo aumento na especificidade do DR 4-DW4 em pacientes com AR (Stastny, 1976). Após estes achados iniciais, inúmeros trabalhos confirmaram a presença do antígeno HLA-DR4 em pacientes com AR e fator reumatóide positivo (Karr et al., 1980; Queiros, Sancho, Caetano, 1982; Oslen et al., 1988; Westedt et al., 1986; Gough et al., 1994). O método de estudo empregado foi o de associação, isto é, as freqüências dos antígenos HLA foram comparadas entre pacientes do mesmo grupo étnico. Contudo, trabalhos demonstraram que, nem todos os grupos raciais apresentaram associações com o antígeno HLA-DR4.

Posteriormente, a especificidade do DR1 foi vinculada a AR em populações mediterrâneas e indianas (Woodrow et al., 1981; Taneja et al., 1993) e a especificidade do DR4-DW15 em japoneses e chineses com AR (Ohta 1982; Boey, 1992).

Após o advento da avaliação da seqüência de DNA, foi postulado que os alelos DR1 e DR4 (DRB1*0101,*0102,*0401*0404,*0405,*0408) associados com AR, bem como o DRB1*1001 e *1402, apresentavam uma seqüência comum de aminoácidos em sua terceira região hipervariável, particularmente na seqüência 67-74. Esta observação levou à hipótese do epitopo semelhante (“shared epitope” – SE), que codifica uma unidade funcional distinta, cujas propriedades imunológicas são alteradas por mudanças dos aminoácidos chaves dentro desse epítopo (Hiraiwa, Yamanaka, Kwok, 1990).

A prevalência de dois alelos suscetíveis, em um único indivíduo, confere maior suscetibilidade genética na AR. Estudos demonstraram que pacientes

homozigotos para HLA-DR4 ou com alelos apresentando sequências semelhantes na região 70-74, têm doença articular e extra-articular mais agressiva (Weyand et al., 1992; Wordsworth et al., 1992; Toda et al., 1994), demonstraram que combinações entre os alelos HLA-DRB1 *0401, *0404, *0405, *0101, predispõem a uma doença mais agressiva, sugerindo que mecanismos sinérgicos estejam envolvidos para determinar a agressividade na AR.

Por outro lado, de acordo com o modelo de proteção da Artrite Reumatóide (RAP model), um grupo de alelos contém, ao invés do epitopo semelhante, uma outra região âncora, que consiste dos aminoácidos DERRA. Os alelos HLA-DRB1 que expressam essa sequência DERRA (DRB1*0103, *0402, *1102, *1103, *1301, *1302 e *1304) parecem conferir proteção contra o desenvolvimento da AR. Algumas evidências sugerem que a doença seja menos erosiva em pacientes com a sequência DERRA. Esse modelo tem sido suportado por alguns estudos em pacientes caucasóides com Artrite Reumatóide.

No entanto, tanto em relação à teoria do epitopo semelhante quanto à de proteção (RAP model), inúmeras diferenças já foram demonstradas em estudos de vários grupos étnicos; concluindo que os resultados encontrados em uma população não servem como modelo para todas as populações.

De acordo com o Programa Nacional de Doadores de Medula Óssea dos Estados Unidos (o qual compreende mais de 1.35 milhões de voluntários sadios tipados para HLA), existem diferenças significativas nas frequências dos alelos HLA-DR4 entre indivíduos de ancestralidade europeia e afro-americanos. Silman et al (2007), em estudo recente observou alelos HLA-DRB1*04 em apenas 1 (1,8%) de 55 indivíduos em uma população rural da Nigéria.

Poucos estudos foram realizados em populações afro-descendentes com Artrite Reumatóide, assim o papel do HLA-DRB1 neste grupo étnico ainda permanece impreciso.

O Brasil recebeu 37% de todos os escravos africanos que foram trazidos para as Américas, totalizando mais de três milhões de pessoas; sendo hoje, o país com a maior população de origem africana fora da África (Davis, 2000).

A mistura genética entre populações europeias e africanas, que vieram para o Brasil desde o período de sua colonização, pode ser um fator contributivo para uma possível diferença na susceptibilidade e agressividade da AR na população afro-

brasileira. Diante do exposto, torna-se justificável e necessário o estudo desta população com Artrite Reumatóide.

1.6 A Miscigenação

Os grupos indígenas que habitavam o Brasil na época de seu descobrimento somavam talvez, 5 milhões de índios, divididos em dezenas de grupos tribais, como os Tupi (em sua maioria), Xavante, Kayapó, Guaikuru, dentre outros. Os portugueses que no Brasil aportaram em 1500, eram um grupo pequeno com etnia miscigenada, decorrente da ocupação árabe e do grande contingente judeu que povoou a península ibérica por vários anos. Os portugueses eram, na sua imensa maioria, homens. Assim que, a primeira fase da formação do povo brasileiro foi constituída por esses homens portugueses e matrizes índias. Com o decorrer dos séculos, os portugueses perfizeram um total de 1,7 milhões de imigrantes no Brasil (Ribeiro, 1995).

Os primeiros contingentes de negros foram introduzidos no Brasil nos últimos anos da primeira metade do século XVI, talvez em 1538. Os negros do Brasil foram trazidos principalmente, da costa ocidental africana. Três grandes grupos foram distinguidos. O primeiro, das culturas sudanesas é representado pelos grupos Yoruba, Dahomey, Fanti-Ashanti e , por grupos menores da Gâmbia, Serra Leoa, Costa do Marfim e Costa da Malagueta. O segundo grupo era representado por culturas africanas islâmicas, principalmente do norte da Nigéria. O terceiro grupo era o congo-angolês (tribos Bantu), provenientes da área que hoje corresponde a Angola e Moçambique. As estimativas relacionadas à quantidade de negros introduzidos no Brasil entre os séculos XVI e XVIII variam muito, mas, segundo M. Buescu (1968), um número próximo do real estaria em torno de 6 milhões de negros.

Principalmente após 1850, outros grupos europeus vieram juntar-se aos povoadores portugueses dos primeiros séculos; como os italianos (cerca de 1,6 milhões), espanhóis (700 mil), alemães (mais de 250 mil) e japoneses (cerca de 230 mil) (Ribeiro, 2000).

Assim, surgiu o povo brasileiro, oriundo do cruzamento de brancos (principalmente, mas não exclusivamente, portugueses), com milhares de mulheres índias e , principalmente, negras.

1.7 Afro-Brasileiros

O assunto raça é controverso e sensível. É consenso na Sociologia que raça é uma construção social, com pouca base biológica. No século XIX, no Ocidente, as teorias científicas estabeleceram que os seres humanos poderiam ser divididos em tipos raciais distintos segundo uma ideologia que determinava que tais características estavam correlacionadas com traços intelectuais e comportamentais de uma pessoa. Embora atualmente essas teorias estejam desacreditadas pela maioria da comunidade científica, elas continuam arraigadas a crença popular, fazendo com que as pessoas continuem a “classificar” e tratar o outro segundo idéias socialmente aceitas.

As ideologias raciais evoluíram de formas distintas no Brasil e nos Estados Unidos (Gans e Wacquant, 1999). Eles são os dois maiores países do hemisfério ocidental, tanto em tamanho quanto em população de origem africana. O termo “raça” empregado nos Estados Unidos é, no Brasil, usualmente substituído pelo termo “cor”. No Brasil, a classificação racial de uma pessoa varia de acordo com a classificação utilizada. Atualmente, dispomos de três grandes sistemas de classificação nacional para caracterizar a grande maioria de brasileiros de um “continuum” de cores do branco ao preto. São esses: (1) Censos com suas três categorias branco, pardo e preto (excluindo-se ainda, as categorias indígena e amarela); (2) discurso popular com termos ambíguos como moreno, moreno-claro e o (3) movimento negro, cada vez mais adotado, que utiliza os termos branco e negro (Telles, 2003).

Tendo em vista essa diversidade de critérios, bem como a flexibilidade de classificação de cor no Brasil, pretos e pardos são geralmente considerados juntos nas pesquisas, constituindo uma única categoria, assumindo-se que esses indivíduos possuem ascendência africana. Existe muita celeuma, no entanto, quanto à adequação dos termos negro, negróide ou afro-descendente, para designar essa

categoria étnica, nem sempre havendo concordância entre o cientificamente adequado e o politicamente correto.

A união em uma única categoria de pretos e pardos torna-se ainda mais justificável quando se toma por base estudos genéticos: 86% dos brasileiros têm algum grau de ascendência africana. Os genes africanos no povo brasileiro variam de 10 a 100% da ancestralidade. Portanto, devido ao alto grau de miscigenação, brasileiros com ascendência africana podem ou não apresentar traços de fisionomia negra (Pena, 2004).

Uma recente pesquisa genética, encomendada pela BBC Brasil, analisou a ancestralidade de afro-brasileiros. A pesquisa contou com a participação de 120 brasileiros auto-declarados negros de São Paulo. Para tal, foram analisados o cromossomo Y, herdado do pai, e o DNA mitocondrial, herdado da mãe. Ambos são passados de geração em geração e, por não se misturarem com outros materiais genéticos, permanecem intactos, salvo raras exceções de mutação. Analisando-os, pode-se encontrar a informação de que parte do mundo um ancestral relativamente próximo de uma pessoa veio. Concluiu-se que, do lado paterno, metade (50%) dos negros brasileiros analisados têm um antepassado que veio da Europa, 48% que veio da África e 1,6% que era indígena. Do lado materno, 85% têm uma antepassada africana, 12,5% índia e apenas 2,5% européia (Pena, 2004).

A explicação para uma maior ancestralidade européia no lado paterno de negros brasileiros e uma maior ancestralidade africana do lado materno se deve ao fato de que, como dito anteriormente, por muito tempo na História do Brasil, havia mais homens brancos que mulheres brancas. Por esse fator, as relações interraciais entre homens europeus e mulheres africanas ou indígenas eram bastante comuns.

Baseado nos fatos acima apresentados, este trabalho irá avaliar no Brasil, um grupo de pacientes afro-brasileiros com Artrite Reumatóide e caracterizá-lo quanto à presença dos antígenos de histocompatibilidade classe II DR e sua susceptibilidade clínica.

2. OBJETIVOS

- 1- Identificar os alelos do HLA-DRB1 em uma população afro-brasileira de pacientes com Artrite Reumatóide e controles saudáveis.
- 2- Determinar as freqüências desses alelos no grupo de pacientes e compará-las com as freqüências observadas no grupo de controles saudáveis.
- 3- Determinar as contribuições do polimorfismo do HLA-DRB1 em relação à susceptibilidade da Artrite Reumatóide (AR) em uma amostra populacional afro-brasileira
- 4- Determinar se a teoria do Epitopo Semelhante (SE) se aplica aos pacientes afro-brasileiros com Artrite Reumatóide.
- 5- Determinar se o modelo de proteção da Artrite Reumatóide (RAP Model) se aplica aos pacientes afro-brasileiros com Artrite Reumatóide.

3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

3.1 Critérios de Inclusão dos Sujeitos de Pesquisa

- Pacientes com diagnóstico de Artrite Reumatóide segundo os critérios do American College of Rheumatology, com idade igual ou superior a 18 anos.
- Critério de “afro-brasileiro”:
“Afro-brasileiro” = classificação do investigador para o paciente “preto”ou “pardo”(Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE), associado à ascendência negra de linhagem materna até 3º geração

3.2 Critérios de Exclusão dos Sujeitos de Pesquisa

- Idade inferior a 18 anos.
- Pacientes não portadores de Artrite Reumatóide
- Pacientes com Artrite Reumatóide porém, não afro-brasileiros.
- Indivíduos sem capacidade para compreender os objetivos do estudo.
- Indivíduos impedidos legalmente de participar do estudo.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Pacientes:

Foram estudados 72 pacientes, com diagnóstico de AR segundo os critérios propostos pelo American College of Rheumatology (ACR), e que preenchem o critério de “afro-brasileiro” proposto neste estudo. Todos os pacientes eram habitantes do Estado de São Paulo e foram acompanhados no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (HC-FCM-UNICAMP) e no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil.

4.1.2 Controles:

75 voluntários sadios da mesma área geográfica e do mesmo grupo étnico foram estudados como grupo controle. Estes indivíduos foram recrutados a partir de doadores sadios de sangue e órgãos sólidos ou doadores de transplante de células primárias hematopoiéticas.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e todos os sujeitos de pesquisa assinaram Termo de Consentimento Livre e esclarecido para participar do estudo.

4.1.3 Critérios Clínicos:

Foi elaborada uma ficha clínica para todos os pacientes, contendo os dados referentes à idade, sexo, idade de início da doença, duração da doença, envolvimento articular e manifestações extra-articulares (presentes no exame físico ou relatadas anteriormente no prontuário médico do paciente). As manifestações extra-articulares consideradas foram: nódulo reumatóide, fenômeno de Raynaud, serosites, vasculites, ceratoconjuntivite, uveíte e neuropatia.

4.1.4 Exames Subsidiários:

Fator Reumatóide (FR): Foi avaliado em todos os pacientes e considerado positivo com valores superior à 1:40(teste aglutinação látex) ou 10 UI/ml (Waalder Rose).

4.1.5 Critérios Diagnósticos de Artrite Reumatóide pelo ACR:

A partir dos dados clínicos e laboratoriais, foram determinados o número de critérios do ACR presentes para cada paciente (Quadro 1).

Quadro 1- Critérios diagnósticos de Artrite Reumatóide pelo ACR

1- Rigidez matinal das articulações, por pelo menos uma hora
2- Artrite de três ou mais articulações, observada por médico
3- Artrite das articulações das mãos
4- Artrite simétrica
5- Nódulo Reumatóide
6- Presença de Fator Reumatóide
7- Erosão óssea, ao exame radiográfico, e(ou) osteopenia justa-articular nas mãos ou punhos.

Os critérios 1 à 4 devem estar presentes, pelo menos, durante seis semanas.

Artrite reumatóide é definida pela presença de quatro ou mais critérios.

4.2 Métodos

4.2.1 Análise Molecular

4.2.1.1 Extração de DNA:

Obtenção dos leucócitos

A partir de 5ml de sangue periférico, colhido em frasco de vacutainer, com EDTA 15% como anticoagulante, foi realizada a lise das hemácias para a obtenção dos leucócitos das amostras da casuística.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1.800 rpm, por 10 minutos. Depois, o plasma foi descartado e as hemácias lisadas com uma mistura de uma solução 1:10 de cloreto de amônio NH₄Cl (0,144moles/litro) e bicarbonato de amônio NH₄HCO₃ (0,01moles/litro), por 20 minutos em repouso à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as amostras foram centrifugadas a 3600 rpm, por 15 minutos, sendo depois descartado o sobrenadante. O processo de lise foi repetido até que se obtivesse um “pellet” de leucócitos livres de hemácias.

Lise dos leucócitos e precipitação do DNA

Ao “pellet” de leucócitos, foram adicionados 1ml de DNAzol™ (Invitrogen). As amostras contendo o DNAzol™ foram mantidos por 3 horas em repouso à temperatura ambiente, acrescentado em seguida 1ml de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA, que foi retirado com a ajuda de uma pipeta Pasteur e colocado em um eppendorf contendo 300ul de etanol 70% gelado. As amostras foram então lavadas com a ajuda de uma pipeta Pasteur e o etanol descartado. Para a diluição do DNA foi utilizado de 150 a 300ul de água destilada estéril, de acordo com o “pellet” de DNA obtido. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C “overnight” para a sua solubilização. A quantificação do DNA foi realizada pelo **High DNA Mass™ Ladder (Invitrogen)**, um marcador de massa molecular baseado na comparação da intensidade da banda da amostra de DNA teste com a intensidade das bandas do marcador. As amostras foram então estocadas a -20° C para posterior genotipagem.

4.2.1.2 Tipagem e subtipagem dos alelos do HLA-DR

Reação em cadeia da polimerase por seqüências específicas de “primers” (PCR-SSP)

PCR-SSP - HLA-DR de baixa resolução

A genotipagem do HLA-DR foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências específicas de primers (**PCR-SSP HLA-DR baixa resolução – DYNAL, Biotech Ltd., UK**). Para cada amostra de DNA dos pacientes, foram realizados os seguintes procedimentos: em

placas de 24 “wells” contendo “primers” liofilizados (um par de “primers” do gene do crescimento humano de seqüência não alélica como controle interno da reação, e um par de “primers” específicos do HLA-DR) foi adicionado 10 *ul* de uma solução contendo: 224 *ul* (tampão PCR, glicerol 5%, nucleotídeos dCTP, dGTP, dATP, dTTP, vermelho cresol), 53,2 *ul* da amostra do DNA (~50ng/*ul*) e 2,24*ul* de *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)*. Em seguida, a amplificação da PCR foi realizada em um Termociclador, num total 30 ciclos com desnaturação inicial a 96°C durante dois minutos, seguida dos 10 primeiros ciclos com desnaturação a 96°C, por 15 segundos, pareamento e extensão a 65°C, por 60 segundos e após 20 ciclos com desnaturação a 96°C, por 10 segundos, anelamento a 61 °C, por 50 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos (OLERUP 1994). Para a subtipagem do HLA-DR foi utilizado também a técnica de reação em cadeia de polimerase por de seqüências específicas de primers, porém de alta resolução (*DYNAL, Biotech Ltd., UK*)

Detecção dos Produtos Amplificados pela PCR

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

4.2.2 Agrupamento de Alelos de Acordo com os Modelos de Epitopo Semelhante (SE) e de Proteção da Artrite Reumatóide (Rap Model)

A frequência dos alelos DRB1 considerados como pertencentes ao grupo do epitopo semelhante foi calculada pela soma das freqüências individuais dos alelos HLA-DRB1*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *1001 e *1402. Pacientes apresentando um ou dois alelos do epitopo semelhante foram classificados como epitopo-semelhante positivo.

Os alelos considerados DRB1 protetores (todos codificados com a seqüência DERAA na HV3) são os alelos *0103, *0402, *1102, *1103, *1301 e *1302; previamente reportados como alelos DERAA-positivos. Este estudo utiliza o termo

alelos DERAA-codificados mas não diferencia entre o efeito direto desses alelos e o efeito de outros alelos vinculados aos alelos DERAA-codificados.

Para a análise, 6 grupos foram formados, de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2: Agrupamento de alelos de acordo com os modelos do epitopo semelhante (SE) e RAP Model (DERAA)

Grupo A: homozigoto para epitopo semelhante (SE/SE)

Grupo B: 1 alelo epitopo semelhante e 1 alelo não epitopo semelhante e não DERAA(SE/X)

Grupo C: 1 alelo epitopo semelhante e 1 alelo DERAA (SE/DERAA)

Grupo D: não epitopo semelhante e não DERAA (X/X)

Grupo E: 1 alelo DERAA (X/DERAA)

Grupo F: homozigoto para alelo DERAA (DERAA/DERAA)

4.2.3 Método Estatístico

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%) e as quantitativas por média, desvio padrão (dp), mediana, valores mínimo e máximo.

Para comparação de proporções foi utilizado o teste de Qui-Quadrado ou o teste Exato de Fisher, quando necessário.

Para comparação de medidas contínuas entre 2 grupos foi aplicado o teste de Mann-Whitney

Para todas as associações significantes foi calculado o odds ratio (OR) e seu respectivo intervalo com 95% de confiança (IC95%).

Devido à possível associação entre os alelos subtipados e grande quantidade de testes aplicados, para as comparações dos alelos o valor de p foi corrigido pelo método de Bonferroni e esse novo valor foi chamado de pc (p corrigido).

Adotou-se o nível de significância global de 0,05 (alfa = 5%).

5. RESULTADOS

5.1 Características Clínicas e Epidemiológicas

Dos 72 pacientes avaliados, 56 (77,8%) eram do sexo feminino e 16 (22,2%) do masculino. A idade média foi de 48,5 anos e desvio padrão de 10,5 anos. A idade média de início da doença foi de 38,5 anos e desvio padrão de 10,5 anos. A média de tempo de doença foi de 10,6 anos e desvio padrão de 8,4 anos. As manifestações extra-articulares estavam presentes em 08 pacientes (11,1%). O Fator Reumatóide foi positivo em 54 pacientes (75%) (Tabela 1).

O envolvimento extra-articular mais freqüente foi a Síndrome de Sjogren que ocorreu em 03 pacientes (4,1%). Dois pacientes apresentaram nódulos subcutâneos. Um paciente manifestou uveíte, outro escleromalácia e neuropatia periférica foi observada em um caso (Tabela 2).

Tabela 1: Características Epidemiológicas e Clínicas dos Pacientes Afro-Brasileiros

variáveis	Pacientes (n = 72)	
	n	%
mulheres	56	77.8
homens	16	22.2
man. extra-articulares SIM	8	11.1
man extra-articulares NÃO	64	88.9
FR negativo	18	25.0
FR positivo	54	75.0
média (dp) de idade (anos)	48.5(10.5)	
média (dp) de idade de inicio da doença (anos)	38.5(10.5)	
média (dp) de tempo de doença(anos)	10.6 (8.4)	

Tabela 2: Manifestações extra-articulares em 72 pacientes afro-brasileiros com AR.

Manifestações Extra-Articulares	Total de pacientes (%)
Síndrome de Sjogren	4,1
Nódulo Reumatóide	2,8
Uveíte	1,4
Escleromalácia	1,4
Neuropatia periférica	1,4

5.2 Alelos HLA

A genotipagem do HLA-DR dos 72 pacientes e 75 controles afro-brasileiros foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase, utilizando seqüências específicas de primers. Após a reação de amplificação, 4µl do produto da PCR de cada “well” da placa, foram aplicados em uma cuba de eletroforese horizontal contendo gel de agarose 2%. Os produtos da PCR foram visualizados sob iluminação ultravioleta, e os resultados analisados (Figura 3).

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 2% da amplificação do DNA de 72 pacientes e 75 controles afro-brasileiros.



C.I.= bandas de amplificação do controle interno (gene do crescimento humano)

M= marcador de peso molecular 100 bp (*Invitrogen*)

1-24= número de tubos contendo os primers específicos para os alelos HLA-DRB1*

Bandas 1, 3 e 24 = amplificação específica dos alelos HLA-DRB1*01, DRB1*15; DRB5

5.3 Distribuição dos Alelos HLA-DRB1

O alelo HLA-DRB1*0404 estava presente em 11 pacientes (15,3%) e o alelo HLA-DRB1*0405 em 06 pacientes (8,3%) (Gráfico 1 e 2). Ambos os alelos apresentaram frequência significativamente maior nos pacientes do que no grupo controle (p -valor 0,259, ODDS 6,58 e 95% IC 1,40-30,84 e p -valor 0,444 ODDS 7,94; respectivamente).

O alelo HLA-DRB1*0102 estava presente em 07 controles (9,3%) e em nenhum paciente (0%) (p -valor 0,518, ODDS 0,12 e 95%IC 0,01-0,97) (Gráfico 3).

Os alelos DRB1 considerados como pertencentes ao grupo do epitopo semelhante (HLA-DRB1*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *1001 e *1402) estavam presentes em 39 pacientes (54,2%) e em 20 controles (26,7%) (Gráfico 4).

A distribuição da subtipagem dos alelos HLA-DRB1 no grupo controle e nos pacientes afro-brasileiros pode ser vista na Tabela 3.

Gráfico 1: Frequência de alelos HLA-DRB1*0404 em pacientes e controles

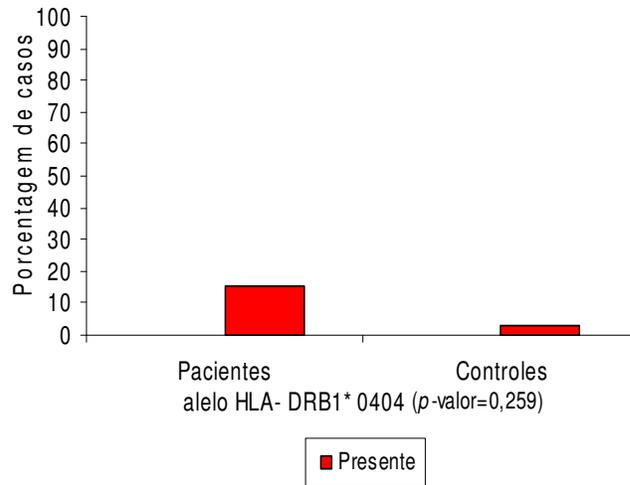


Gráfico 2: Frequência de alelos HLA-DRB1*0405 em pacientes e controles

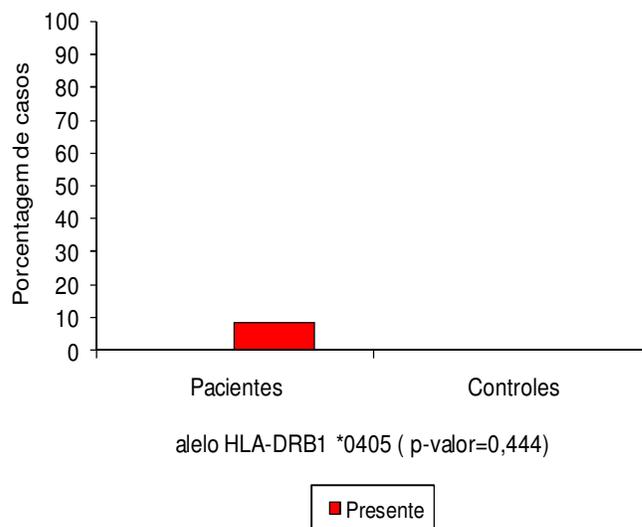


Gráfico 3: Frequência de alelos HLA-DRB1*0102 em pacientes e controles

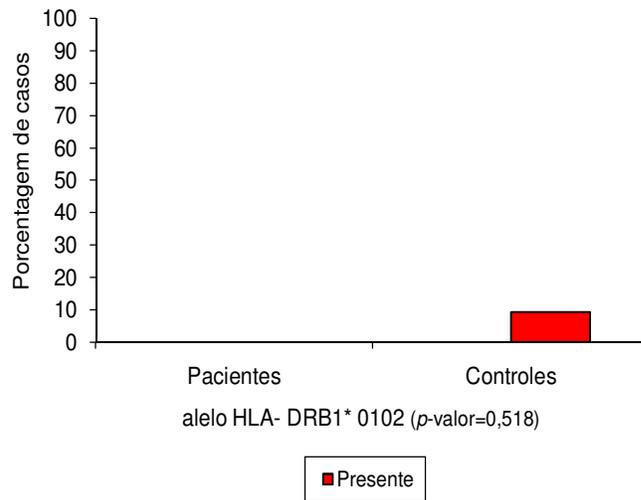
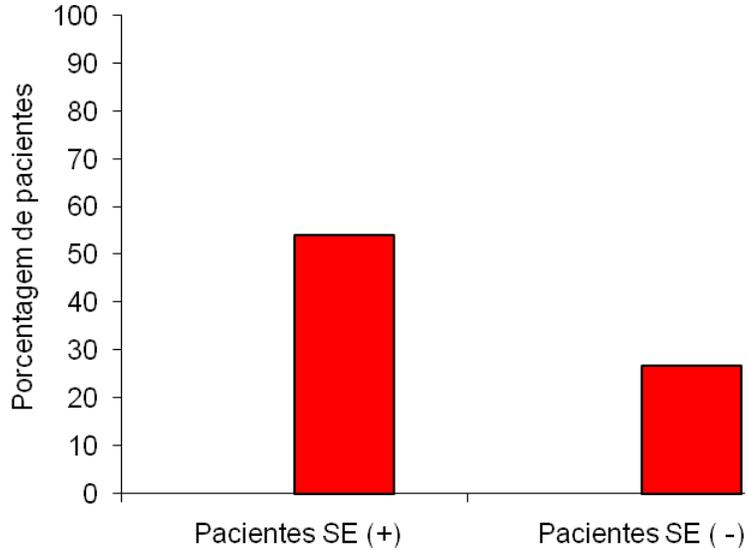


Gráfico 4: Frequência de epitopos semelhantes (SE) em pacientes afro-brasileiros



5.4 Alelos DERA-Positivo (RAP MODEL) e a Influência do Epitopo Semelhante

A fim de estudar o efeito da presença da sequência DERA na susceptibilidade da Artrite Reumatóide, pacientes e controles foram divididos em 6 grupos de acordo como genótipo de seu HLA-DRB1 (Tabela 4). O efeito geral do DERA no desenvolvimento da Artrite Reumatóide foi avaliado comparando-se a presença da sequência DERA (grupos C,E e F) com sua ausência (grupos A,B e D).

A presença de DERA foi menos presente nos pacientes com AR (25%) do que nos controles (36%), conferindo um ODDS de 0,59; porém sem significância estatística.

O efeito da sequência DERA na ausência dos alelos epitopo-semelhante foi avaliada comparando-se o grupo E(X/DERA) mais o grupo F(DERA/DERA) com o grupo D(X/X). Sujeitos com a sequência DERA apresentaram risco reduzido de desenvolver Artrite Reumatóide (ODDS=0,41), apesar do efeito observado não ter sido estatisticamente significativo (=0,067, 95% CI=0,16-1,08) (Tabela 4).

Tabela 3: Subtipagem dos antígenos HLA-DRB1

Fator	DRB1 allele	Pacientes	Controles	p-valor	p-valor ¹	ODDS	IC de 95%
		n = 72	n = 75				
Agressor	*0101	13 (18,1%)	7 (9,3%)	0,123	ns	2,14	0,80 – 5,72
Agressor	*0102	0 (0%)	7 (9,3%)	0,014	0,518	0,12	0,01 – 0,97
Protetor	*0103	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-	-
-	*1501	9 (12,5%)	4 (5,3%)	0,126	ns	2,54	0,74 – 8,64
-	*1502	3 (4,2%)	1 (1,3%)	0,360	ns	3,22	0,33 – 31,67
-	*1503	4 (5,6%)	10 (13,3%)	0,108	ns	0,38	0,11 – 1,28
-	*1601	0 (0%)	2 (2,7%)	0,497	ns	0,34	0,03 – 3,32
-	*1602	4 (5,6%)	3 (4%)	0,715	ns	1,41	0,30 – 6,54
-	*0301	10 (13,9%)	12 (16%)	0,720	ns	0,85	0,34 – 2,10
-	*0302	5 (6,9%)	6 (8%)	0,808	ns	0,86	0,25 – 2,95
Agressor	*0401	5 (6,9%)	1 (1,3%)	0,111	ns	5,52	0,63 – 48,48
Protetor	*0402	0 (0%)	3 (4%)	0,245	ns	0,25	0,03 – 2,29
-	*0403	1 (1,4%)	2 (2,7%)	1,000	ns	0,51	0,05 – 5,80
Agressor	*0404	11 (15,3%)	2 (2,7%)	0,007	0,259	6,58	1,40 – 30,84
Agressor	*0405	6 (8,3%)	0 (0%)	0,012	0,444	7,94	0,95 – 66,21
-	*0406	0 (0%)	1 (1,3%)	1,000	ns	0,51	0,05 – 5,79
-	*0407	0 (0%)	1 (1,3%)	1,000	ns	0,51	0,05 – 5,79
-	*0411	0 (0%)	2 (2,7%)	0,497	ns	0,34	0,03 – 3,32
-	*1101	3 (4,2%)	8 (10,7%)	0,134	ns	0,36	0,09 – 1,43

Protetor	*1102	1 (1,4%)	3 (4%)	0,620	ns	0,34	0,03 – 3,33
Protetor	*1103	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-	-
-	*1104	1 (1,4%)	5 (6,7%)	0,210	ns	0,20	0,02 – 1,73
-	*1201	3 (4,2%)	2 (2,7%)	0,677	ns	1,59	0,26 – 9,79
-	*1202	0 (0%)	1 (1,3%)	1,000	ns	0,51	0,05 – 5,79
Protetor	*1301	9 (12,5%)	12 (16%)	0,544	ns	0,75	0,30 – 1,91
Protetor	*1302	9 (12,5%)	9 (12%)	0,926	ns	1,05	0,39 – 2,81
-	*1303	6 (8,3%)	1 (1,3%)	0,060	ns	6,73	0,79 – 57,34
-	*1401	2 (2,8%)	5 (6,7%)	0,442	ns	0,40	0,08 – 2,13
Agressor	*1402	3 (4,2%)	2 (2,7%)	0,677	ns	1,59	0,26 – 9,79
-	*0801	3 (4,2%)	4 (5,3%)	1,000	ns	0,77	0,17 – 3,58
-	*0802	0 (0%)	1 (1,3%)	1,000	ns	0,51	0,05 – 5,79
-	*0804	4 (5,6%)	5 (6,7%)	1,000	ns	0,82	0,21 – 3,20
-	*0807	0 (0%)	2 (2,7%)	0,497	ns	0,34	0,03 – 3,32
-	*07	9 (12,5%)	17 (22,7%)	0,106	ns	0,49	0,20 – 1,18
-	*0901	8 (11,1%)	4 (5,3%)	0,201	ns	2,22	0,64 – 7,72
Agressor	*1001	10 (13,9%)	4 (5,3%)	0,077	ns	2,86	0,85 – 9,59
-	*1304	1 (1,4%)	0 (0%)	0,490	ns	2,11	0,19 – 23,79

p-valor¹ = p-valor*37; os valores de p-valor¹ acima de 1 foram representados por “ns”

Agressor= epitopo semelhante; **Protetor**= alelos DERAAs positivos

Tabela 4: Frequências dos genótipos DRB1 de acordo com a presença de alelos predisponentes (epitopo semelhante) e alelos protetores (DERAA) em pacientes afro-brasileiros com Artrite Reumatóide e controles.

Variável	Pacientes	Controles
	n = 72	n = 75
SE/SE (A)	12 (16,7%)	3 (4,0%)
SE/X (B)	17 (23,6%)	14 (18,7%)
SE/DERAA (C)	10 (13,9%)	3 (4,0%)
X/X (D)	25 (34,7%)	31 (41,3%)
X/DERAA (E)	7 (9,7%)	24 (32,0%)
DERAA/DERAA (F)	1 (1,4%)	0 (0,0%)
p = 0,148		
(C+E+F) x (A+B+D)		OR = 0,59 [0,29; 1,21]
p = 0,067		
(E+F) x (D)		OR = 0,41 [0,16; 1,08]
SE-positivo	39 (54,2%)	20 (26,7%)

6. DISCUSSÃO

Fatores genéticos, raciais e ambientais têm sido identificados como fatores predisponentes ou modificadores de muitas enfermidades reumáticas. Existe um aumento da incidência de LES em negros americanos, bem como maior frequência da polimiosite em negros. Um estudo conduzido no Zimbábwe comparou um grupo de pacientes negros com AR daquela região com um grupo de pacientes caucasianos da Inglaterra e demonstrou que a AR apresentava uma característica menos severa no primeiro grupo, sugerindo que a doença seja mais branda em pacientes negros (Chikanza et al., 1994). A população de pacientes afro-brasileiros estudada apresentou poucas manifestações extra-articulares (11,1%), fato este que corrobora com os dados descritos na literatura de que a AR parece ser mais branda em pacientes negros. Já, a frequência de FR foi muito similar à descrita na literatura (75%).

A relação entre mulheres e homens com AR em nosso estudo foi de 3,5:1. Essa relação é maior do que a descrita na literatura (2:1) (Consenso Brasileiro Artrite Reumatóide, 2008).

O polimorfismo dos diferentes genes HLA contribui para que alguns alelos estejam primariamente associados à AR em certas populações, mas não em outras. Uma análise visando relacionar estes genes com uma patologia requer, portanto, um grupo com a doença bem definida. Assim, a seleção dos pacientes deste estudo baseou-se nos critérios do ACR para AR. O fato desta casuística englobar doentes com longo tempo de doença (média de 10.6 anos), portanto com acompanhamento clínico longitudinal, também colaborou para que essa seleção fosse mais precisa.

Na análise estatística dos alelos HLA utilizamos a correção do valor de “*p*”, reduzindo-se assim, as chances de erros estatísticos. O valor de “*p*” corrigido corresponde ao valor de “*p*” multiplicado pelo número de antígenos HLA pesquisados, conhecido por método de Bonferroni.

A importância da análise da sequência do locus DRB1 baseia-se nos diversos estudos que verificaram que a AR se relaciona com a positividade de HLA-DRB1*01 e HLA-DRB1*04 (Klareskog et al., 1982). Através de técnicas de genotipagem, pode-se identificar os alelos do locus DRB1 e suas sequências de aminoácidos e, a partir

desses achados, determinar quais alelos estão mais frequentemente associados à AR em determinada população (Gregersen, 1992).

A associação da AR com antígenos de histocompatibilidade HLA-DRB1 vem sendo demonstrada em inúmeros estudos, em diferentes populações. A associação mais frequentemente citada é com o HLA-DRB1*04, sugerindo, essa associação, um aumento da susceptibilidade à AR. Neste estudo, a frequência do HLA-DRB1*04 nos pacientes com AR foi de 16,6%, enquanto que, no grupo controle, foi de 13,3%. Contudo, esse aumento da frequência não foi significativo. A frequência do HLA-DRB1*01 foi semelhante entre os pacientes afro-brasileiros e os controles (18%). Estes dados são diferentes dos encontrados em um estudo que analisou o padrão HLA em indivíduos brasileiros caucasóides com Artrite Reumatóide (Bértolo M, 1998), o que aponta para uma possível diferença nas origens étnicas da população brasileira caucasóide e da afro-descendente.

Já, quando avaliamos a distribuição dos subtipos dos alelos HLA-DRB1 nos pacientes afro-brasileiros, observamos que os alelos HLA-DRB1 *0404 e *0405 apresentaram frequência significativamente maior nos pacientes do que no grupo controle (p -valor 0,259, ODDS 6,58 e 95% CI 1,40-30,84 e p -valor 0,444 ODDS 7,94; respectivamente). Tanto o alelo DRB1*0404 quanto o alelo DRB1*0405 apresentam uma sequência de nucleotídeos codificando uma sequência de resíduos aminoácidos das posições 67 à 74 da terceira região hipervariável (HV3) da cadeia DRB1, essa sequência é conhecida por epitopo semelhante(SE) da Artrite Reumatóide. A sequência de aminoácidos encontrada nos alelos HLA DRB1*0404 e *0405 é a QRRAA (compartilhando arginina na posição 71).

A presença do subtipo DRB1*0405 foi anteriormente associada principalmente, a populações de origem japonesa (Otha et al., 1998), chinesa, coreana, espanhola e árabe; populações essas que tiveram grande influência na colonização do Brasil, em especial na região geográfica onde nosso estudo foi conduzido. Em contrapartida, um estudo realizado para avaliar o padrão HLA em indivíduos brasileiros caucasóides com Artrite Reumatóide não evidenciou a presença do alelo HLA-DRB1*0405 nos pacientes avaliados (Bértolo M, 1998); uma vez mais, apontando para uma diferença nas origens étnicas da população brasileira caucasóide e da afro-descendente .

O alelo HLA-DRB1*0404 tem sido frequentemente associado à susceptibilidade e à agressividade da Artrite Reumatóide em populações caucasóides. O mesmo estudo acima descrito, realizado para avaliar o padrão HLA em indivíduos brasileiros caucasóides com Artrite Reumatóide, observou aumento não significativo na freqüência do alelo DRB1*0404 e uma associação do mesmo com padrão de doença mais agressiva. (Bértolo, 1998).

A maior freqüência dos alelos HLA-DRB1*0404 e *0405 em nosso estudo, não somente confirma a teoria do epitopo semelhante na susceptibilidade da Artrite Reumatóide em afro-brasileiros, assim como descrito em populações caucasóides, mas também, demonstra a intensa miscigenação racial na formação da população brasileira. Mesmo os afro-brasileiros estudados apresentaram alelos HLA que são característicos de populações européias e asiáticas que originaram a formação da população brasileira.

A presença dos HLA-DRB1*0102, é descrita na literatura como fator de susceptibilidade para AR, segundo o modelo do epitopo semelhante. Em estudo realizado no Brasil para avaliar o padrão HLA em indivíduos caucasóides, o alelo HLA-DRB1*0102 foi associado à susceptibilidade na Artrite Reumatóide (Bértolo, 1998). Em nosso estudo, esta correlação não foi estabelecida. Ao contrário, observou-se uma freqüência aumentada no grupo controle (9,3%), quando comparada com os pacientes (0%) (p -valor 0,518, ODDS 0,12, 95% IC 0,01-0,97). Esses dados parecem indicar que, ao menos na população afro-brasileira, o HLA-DRB1*0102 conferiria um papel protetor na Artrite Reumatóide. Esta diferença nos resultados encontrados talvez possa se justificar pelas características genéticas diferenciadas da população afro-brasileira.

Ainda, ao avaliarmos na população afro-brasileira a teoria do epitopo semelhante, observamos que 54,1% dos pacientes apresentaram a sequência de aminoácidos conhecida como epitopo semelhante; enquanto que apenas 26,7% do grupo controle apresentou essa mesma sequência, fato este que nos leva a observar que a teoria do epitopo semelhante se faz presente na população afro-brasileira com Artrite Reumatóide.

Neste estudo investigamos também, as associações entre os efeitos protetores na susceptibilidade da AR, dos alelos HLA-DRB1 que apresentam a sequência DERRA. Ainda é controverso o quanto o efeito DERRA é realmente

protetor ou se é mero resultado da ausência de uma alelo HLA-DRB1 que apresenta um epítipo semelhante.

Em nosso estudo, a comparação dos subgrupos (Tabela 3) nos permitiu diferenciar os efeitos protetores dos não protetores. Observamos que na população afro-brasileira estudada, os alelos HLA-DRB1 que apresentavam a sequência DERAA, reduziram, de forma independente, o risco de desenvolver AR.

Esses achados são similares aos resultados observados em populações mais homogêneas como a suíça e a holandesa (Van der Helm-van Mil AH et al., 2005).

Foi demonstrado que peptídeos carregando a sequência DERAA são naturalmente processados por células apresentadoras de antígenos, e foi sugerido que o efeito protetor da sequência DERAA é mediado por uma resposta protetora específica de células T (Snijders, 2001). É possível que a sequência DERAA, em especial os alelos DRB1*13, não apenas protegem contra a AR mas, também, poderiam estar associados a doenças de evolução menos severa, como no caso das hepatites B e C (Hohler et al., 1997). Esses achados, além de intrigantes, apontam para a importância de se elucidar esses mecanismos biológicos, uma vez que podem representar uma nova luz na regulação imune pelo sistema HLA.

Em relação ao mecanismo da AR, essa hipótese é capaz de explicar dados de literatura, referindo-se a mutações na sequência de aminoácidos nas posições 67-74 da molécula HLA-DRB1. Assim, essa versão corrobora com a noção de que essa sequência de aminoácidos é central na susceptibilidade à AR e, parece não indicar um papel para outro gene dentro do complexo HLA. O que parece é que a indução de riscos variados na patogênese da AR estaria relacionada com substituições de aminoácidos nessas posições e com uma possível interação desta região com, por exemplo, superantígenos.

Os afro-brasileiros estudados apresentaram uma grande variabilidade de alelos HLA-DR. Os alelos DRB1 encontrados com frequência significativa nos pacientes afro-brasileiros com AR já haviam sido reportados em outras populações não afro-descendentes (HLA DRB1*0405, *0404). Este fato talvez seja explicado pela intensa miscigenação racial presente no Brasil.

Apresentamos vários dados indicando o envolvimento dos alelos HLA-DRB1 na susceptibilidade da Artrite Reumatóide em afro-brasileiros. Os modelos de epítipo semelhante e RAP são associados com a região HV3 do gene DRB1 e são

úteis para se compreender a susceptibilidade imunogênica à AR. Os achados de nosso estudo suportam os modelos correntes em AR, bem como suportam a idéia de que esses modelos não são independentes, mas sim, complementares, como proposto por Zanelli et al (2000).

O epitopo semelhante parece representar a maior contribuição à susceptibilidade da AR. Outros fatores genéticos, no entanto, como os superantígenos, provavelmente podem estar envolvidos, agindo possivelmente, em conjunto com o epitopo semelhante (Verpoort et al., 2007) (Yamada, Yamamoto, 2007). Ainda, fatores ambientais e raciais parecem induzir alterações epigenéticas, contribuindo para a patogênese da Artrite Reumatóide (Gaston, 2008; Criswell et al., 2006).

Acreditamos que nosso estudo possa vir a contribuir de maneira significativa para o entendimento da Artrite Reumatóide em nosso país, e para um melhor acompanhamento e tratamento de nossos pacientes, respeitando-se as características genéticas e raciais de nossa população.

7. CONCLUSÃO

1. Os afro-brasileiros estudados apresentaram uma grande variabilidade de alelos HLA-DR.
2. Os alelos HLA-DRB1 *0404 e *0405 apresentaram freqüência maior nos pacientes afro-brasileiros do que no grupo controle.
3. Os alelos HLA-DRB1*0404 e *0405 encontrados com mais freqüência nos pacientes afro-brasileiros com AR já haviam sido reportados em outras populações não afro-descendente, demonstrando a intensa miscigenação racial presente no Brasil.
4. O alelo HLA-DRB1*0102 apresentou uma freqüência aumentada no grupo controle, quando comparada com os pacientes. Esses dados parecem indicar que, ao menos na população afro-brasileira, o HLA-DRB1*0102 conferiria um papel protetor na Artrite Reumatóide.
5. Os alelos do HLA-DRB1 identificados na população afro-brasileira de pacientes com Artrite Reumatóide e controles saudáveis apontam para uma diferença nas origens étnicas da população brasileira caucasóide e da afro-descendente.
6. A teoria do epitopo semelhante se aplica à população afro-brasileira com Artrite Reumatóide.
7. Na população afro-brasileira estudada, os alelos HLA-DRB1 que apresentavam a sequência DERRA, reduziram, de forma independente, o risco de desenvolver AR; confirmando que o modelo de proteção da Artrite Reumatóide (RAP Model) se aplica à população estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCON, G. S. *Epidemiology of rheumatoid arthritis*. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 21: 589-604.

_____. *Is Rheumatoid Arthritis in African descendants from north and south America the same?* *Semin Arthritis Rheum* 2001; 31: 143-5.

ANAYA, J. M; CORREA, P. A; MANTILLA, R. D. *et al. Rheumatoid rthritis in African Colombians from Quibdo*. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 31: 191-8.

ANDRADE, L. E. C. *Princípios teóricos e básicos em biologia molecular*. *Rev. Bras. Reum* 1993; 33: 31-41.

ARNETT, F. C; *et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.

BENAZET, J. F. *et al. HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in southern France*. Absence of extraarticular disease despite expression of the shared epitope. *J Rheumatol* 1995; 22:607-10.

BÉRTOLO, M. B.; COSTALLAT L. T. L.; PERSOLI L.; COSTA F. *HLA DRB1 alleles and the prognostic of RA in brazilian caucasoid patients*. *J Clin Rheumatol* 2000; 6: 233-5.

BIDWELL, J. *Advances in DNA-based HLA-Typing methods*. *Immunology Today* 1994; 15: 303-7.

BODMER, J. G. *et al. Nomenclature for factors of the HLA system*. *Tissue Antigens* 1995; 46: 1-18.

BOEY, M. L. *et al. HLA in Singapore chinese with rheumatoid arthritis*. *J. Rheumatol* 1992; 19:1517-9.

BOKI, K. A. *et al. Examination of HLA-DR4 as a severity marker for rheumatoid arthritis in Greek patients*. *Ann Rheum Dis* 1993; 52:517-9.

BORTOLINI, *et al. Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African Brazilian populations*. *Hum Biol* 1997; 69:141-59.

BRIDGES Jr., S. L.; HUGHES, L. B.; MIKULS, T. R. *Early rheumatoid arthritis in African-Americans: The CLEAR Registry*. *Clin Exp Rheumatol*. 2003; 21: S138-S145.

BRODSKY, F. M.; LEM, L.; BRESNAHAN, P. A. *Antigen processing and presentation*. *Tissue Antigens* 1996; 47:464-71.

By the Latin American Rheumatology Associations of the Pan-American League of Associations for Rheumatology (PANLAR) and the Grupo Latinoamericano de Estudio de Artritis Reumatoide (GLADAR). First Latin American position paper on the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45: ii7-ii22.

CALIN, A.; ELSWOOD, J. KLOUDA, P. T. *Destructive arthritis, rheumatoid factor, and HLA-DR4*. *Arthritis Rheum* 1989; 32:1221-5.

CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. *Map of the human MHC*. *Immunology Today* 1993; 14: 349-52.

CATHY, D. et al. *A shared HLA-DRB1 sequence confers Rheumatoid Arthritis susceptibility in Greeks*. *Eur J Immunogenet* 1993; 5: 391-8.

CECERE, F. A.; PERSELIN, R. H. *The interaction of pregnancy and the rheumatic diseases*. *Clin Rheum Dis* 1981; 7:747-68

CHAN, K. W. A.; FELSON, D. T.; YOOD, R. A.; WALKER, A. M. *Incidence of rheumatoid arthritis in central Massachusetts*. *Arthritis Rheum*.1993; 36:1691-6.

CHIKANZA, I. C.; STEIN, M.; LUTALO, S.; GIBSON, T. *The Clinical, Serologic and Radiologic Features of Rheumatoid Arthritis in Ethnic Black Zimbabwean and British Caucasian Patients*. *J Rheumatol* 1994; 21:2011-5.

CRISWELL, L. A.; SELDIN, M. F. *Admixed populations and autoimmunity*. *Arthritis Rheum*.2008; 58:335-7.

CRISWELL, L. A. et al. *Smoking interacts with genetic risk factors in the development of rheumatoid arthritis among older Caucasian women*. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1163-7.

CUTBUSH, S.; CHIKANZA, I. C.; BIRO, A. *Sequence Specific Oligonucleotide Typing In Shona Patients With Rheumatoid Arthritis And Healthy Controls From Zimbabwe*. *Tissue Antigens* 1993; 41: 169-72.

DAVIS, J. D. In: DAVIS, J. D. *Afro-brasileiros hoje*. São Paulo: Afiliada; Summus, 2000.

De JUAN, M. D. et al. *Differential association with rheumatoid arthritis (RA) in Basques: High frequency of DR1 and DR10 and lack of association with HLA-DR4 or any of its subtypes*. *Tissue Antigens* 1994; 43:320-3.

DROSOS, A. A.; LANCHBURY, J. S.; PANAYI, G. S.; MOUTSOPOULOS, H. M. *Rheumatoid Arthritis in Greek and British Patients*. *Arthritis and Rheum* 1992; 35:745-8.

DROSSAERS-BAKKER, K. W.; et al. *Long-Term course and outcome of functional capacity in Rheumatoid Arthritis*. *Arthritis and Rheum* 1999; 42:1854-60.

FRANSEN, J.; Van RIEL, P. L. C. M. *The Disease Activity Score and the EULAR response criteria*. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23(Suppl.39):S93-S99.

GAO, X.; BRAUTBAR, C.; GAZIT, E. *A variant of HLA-DR4 determines susceptibility to rheumatoid arthritis in a subset of Israeli Jews*. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 547-51.

GASTON, J. S. *Cytokines in arthritis – the “big numbers” move centre stages*. *Rheumatology* 2008; 47:8-12

GERMAIN, R. N. *Major histocompatibility complex-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation*. *Cell* 1994; 76:287-99

GREGERSEN, P. K. *T-cell receptor-major histocompatibility complex genetic interactions in rheumatoid arthritis*. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 793-7.

GONÇALVES, V. F.; PROSDOCIMI, F.; ORTEGA, J. M.; PENA, S. D. J. *Sex-biased gene flow in African Americans but not in American Caucasians*. *Genetics and Molecular Research* 2007; 6: 156-61.

GONZALES, A. et al. *Novel Genetic Markers of Rheumatoid Arthritis in Chilean Patients, by DR serotyping and restriction fragment length polymorphism analysis*. *Arthritis and Rheum* 1992; 35: 282-9.

GORODESKY, C. et al. *HLA antigens in Mexican patients with adult rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 976-7.

GOUGH, A. et al. *Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome*. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1166-70.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-13.

HANNAFORD, P. C.; KAY, C. R.; HIRSCH, S. *Oral contraceptives and rheumatoid arthritis: New data from the Royal College of the General Practitioners oral contraception study*. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 744-6.

HARRIS, E. D. *Rheumatoid Arthritis: Pathophysiology and implications for therapy*. *N Engl J Med* 1990; 322:1277-89

HIRAIWA, A. et al. *Structural requirements for recognition of the HLA-Dw14 class II epitope- a key HLA determinant associated with rheumatoid arthritis.* Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 8051-5.

HOHLER, T. et al. *MHC class II genes influence the susceptibility to chronic active hepatitis.* C. J Hepatol 1997; 27: 259-264.

HOLMDAHL, R.; KLARESKOG, L.; ANDERSSON, M.; HASEN, C. High antibody response to autologous type II collagen is restricted to H-2q. *Immunogenetics* 1986; 24:84-9.

HONG, G. H. et al. *Association of specific aminoacid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value.* J Rheumatol 1996; 23: 1699-703.

HUGHES, L. B. et al. *The HLA-DRB1 shared epitope is associated with susceptibility to Rheumatoid Arthritis in African Americans through European genetic admixture.* Arthritis Rheum 2008; 58:349-58.

JANEWAY, C. H.; TRAVERS, P. *Immunobiology 1ed.* New York, Garland Publishing Inc.1994.

JARAQUEMADA, D. et al. *HLA and rheumatoid arthritis: A combined analysis of 440 british patients.* Ann Rheum Dis 1986; 45:627-36.

KAMEL, A. In: KAMEL, A. *Não somos racistas.* Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2006.

KARR, R. W.; RDY, J. E.; LEE, T.; SCHWATZ, B. D. *Association of HLA-DRw4 with rheumatoid arthritis in black and white patients.* Arthritis Rheum 1980; 23: 1241-5.

KLARESKOG, L. et al. *Appearance of anti-HLA-DR reactive cells in normal and rheumatoid synovial tissue.* Scan J Immunol 1981; 14: 183-92.

KLARESKOG, L.; FORSUM, U.; WIGREN, A.; WIGZELL, H. *Relationship between HLA-DR-expressing cells and T lymphocytes of different subsets in rheumatoid synovial tissue.* Scand J Immunol 1982; 15:501-7

KLARESKOG, L.; HOLMDAHL, R.; LARSSON, E.; WIGZELL, H. *Role of T lymphocytes in collagen II induced arthritis in rats.* Clin Exp Immunol 1983; 51: 117-25.

KLARESKOG, L.; RONNELID, J.; HOLM, G. *Immunopathogenesis and immunotherapy in rheumatoid arthritis: an area in transition.* J Intern Med 1995; 238: 191-206

KRISHNAN, E.; TUGWELL, P.; FRIES, J. F. *Percentile benchmarks in patients with rheumatoid arthritis: Health Assessment Questionnaire as a quality indicator(QI)*. Arthritis Res Ther 2004; 6:R505-R513.

LÓPEZ-MÉNDEZ, A.; ALAN PAUL, W.; ALARCÓN, G. S. *Rheumatoid Arthritis in American Blacks: A Clinical and Radiological Study*. J Rheumatol 1989; 16: 1197-200.

LOUZADA-JUNIOR, P. et al. *A majority of Brazilian patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1 alleles carry both the HLA-DRB1 shared epitope and anti-citrullinated peptides antibodies*. Braz J Med Biol Res 2008;

MALDA, H. et al. *HLA-DR4 and rheumatoid arthritis in japanese people*. Ann Rheum Dis 1981; 40: 299-302.

MARQUES NETO, J. F. et al. *Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide no adulto em amostras da população brasileira*. Rev Bras Reum 1993; 33:169-73.

MARTINEZ-LASO, J. et al. *HLA DR and DQ polymorphism in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews: comparison with other mediterraneans*. Tissue Antigens 1996; 47:63-71.

MASI, A. T.; FEINBAUM, S. L.; CHATTERTON, N. *Hormonal and pregnancy relationship to rheumatoid arthritis: Convergent effects with immunologic and microvascular systems*. Semin Arthritis Rheum 1995; 25:1-27.

MASSARDO, L. et al. *Weak association between HLA-DR4 and rheumatoid arthritis in Chilean patients*. Ann Rheum Dis 1990; 49: 290-2.

MASSARDO, L. et al. *Clinical expression of rheumatoid arthritis in Chilean patients*. Semin Arthritis Rheum 1995; 25; 203-13.

MATTEY, D. L. et al. *HLA DR-B1 alleles encoding an aspartic at position 70 protect against development of rheumatoid arthritis*. J Rheumatol 2001; 28: 232-9.

MCKEIGUE, P. M.; CARPENTER, J. R.; PARRA, E. J.; SHRIVER, M. D. *Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African-American populations*. Ann Hum Genet 2000; 64:171-86.

MOLOKHIA, M.; MCKEIGUE, P. *Risk for rheumatic disease in relation to ethnicity and admixture*. Arthritis Res 2000; 2:115-25.

NABOZNY, G. H. et al. *HLA - DQ8 transgenic mice are high susceptible to collagen induced arthritis; a novel model for human polyarthritis*. J Exp. Med 1996; 183:27-37.

NEPOM, G. T.; NEPOM, B. S. *Prediction of susceptibility to rheumatoid arthritis by human leucocyte antigen genotyping*. *Rheum Dis North Am* 1992; 18:785-92.

NICHOL, F. E.; WOODROW, J. C. *HLA DR antigens in Indian patients with rheumatoid arthritis*. *Lancet* 1981; 1:220-1

OLLIER, W. E. R.; THOMSON, W. *Populations genetics of rheumatoid arthritis*. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18:741-59.

OLSEN, N. J. et al. *Associations with rheumatoid factor and radiographic severity in rheumatoid arthritis*. *Am J Med* 1988; 84:257-64.

OHTA, N. et al. *Association between HLA and Japanese patients with rheumatoid arthritis*. *Hum Immunol* 1982; 5:123-32.

PASCUAL, M. et al. *Rheumatoid Arthritis in Southern Spain*. *Arthritis Rheum* 2001;44:307-14.

PENA, S. D. J.; BORTOLINI, M. C. *Pode a genética definir quem deve se beneficiar das cotas universitárias e demais ações afirmativas?* *Estud av* 2004; 18(50): 31-50.

PILE, K. D.; TIKLY, M.; BELL, J. I. WORDSWORTH, B. P. *HLA DR antigens and rheumatoid arthritis in Black South Africans: a study of ethnic groups*. *Tissue Antigens* 1992; 39:138-40.

QUEIROS, M. V.; SANCHO, M. R. H.; CAETANO, J. M. *HLA-DR4 antigen and IgM rheumatoid factors*. *J Rheumatol* 1982; 9: 370-3.

REVIRON, D. et al. *Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 2001; 44:535-40.

RIBEIRO, D. In: RIBEIRO, D. *O povo Brasileiro*. São Paulo: Companhia das Letras, 1995.

ROOK, G. A. W. *Is rheumatoid arthritis caused by an infection?* *Rev Bras Reumatol* 1993; 33:211-14.

SALVARANI, C. et al. *Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis and HLA antigens in northern Italy*. *J Rheumatol* 1992; 19:242-6.

SANCHEZ, B. et al. *HLA-DRw10 confers the high susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population*. *Tissue Antigens* 1990; 36:174-6.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. *Epidemiology and genetics of the rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3: S262-72.

SNIJDERS, A. et al. *An HLA-DRB1-derived peptide associated with protection against rheumatoid arthritis is naturally processed by human APCs.* J Immunol 2001; 166:4987-93.

SPECTOR, T. D.; HOCHBERG, M. C. *The protective effect of the oral contraceptive pill on rheumatoid arthritis.* J Clin Epidemiol 1990; 43: 1221-30.

STASTNY, P. *Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis.* J Clin Invest 1976; 57: 1148-57.

STASTNY, P. et al. *HLA-DR4 and other genetic markers in rheumatoid arthritis.* Br J Rheumatol 1988; 27:132-8.

STRACHAN, T. *Molecular genetics and polymorphism of class I antigens.* Br Med Bull 1987; 43:1-14.

TANEJA, V.; MEHRA, N. K.; ANAND, C.; MALAVIYA, A. N. *HLA-linked susceptibility to rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum 1993; 36:1380-6.

TANEJA, V. et al. *Polymorphism of HLA-DRB, -DQA1, and -DQB1 in Rheumatoid Arthritis in Asian Indians. Association with DRB1*0405 and DRB1*1001.* Human Immunology 1996; 46:35-41.

TELLES, E. *Racismo à brasileira: uma nova perspectiva sociológica.* Rio de Janeiro: Relume Dumará, 2003. 347 p.

TODA, Y. et al. *Rheumatoid-susceptible alleles of HLA-DRB1 are genetically recessive to non-susceptible alleles in the progression of bone destruction in the wrists and fingers of patients with RA.* Ann Rheum Dis 1994; 53:587-92.

TODD, J. A. et al. *A molecular basis for major histocompatibility complex class II-associated autoimmunity.* Science 1988; 240:1003-9.

TONUGA, N. K.; NODA, R.; KANEOKA, H. *Association between HLA-DRB1*15 and Japanese patients with Rheumatoid Arthritis complicated by renal involvement.* Nephron 1999; 81: 165-71.

TUOKKO, J.; NEJENTSEV, S.; LUUKKAINEN, R.; TOIVANEN, A.; HONEN, J. *HLA Haplotype in Finnish Patients with Rheumatoid Arthritis.* Arthritis Rheum 2001; 44: 315-22.

ULFGREN, A. K.; LINDBLAD, S.; KLARESKOG, L.; ANDERSSON, J.; ANDERSSON, U. *Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from rheumatoid arthritis patients.* Ann Rheum Dis 1995; 54: 654-61.

VAN Der HELM-Van Mil, A. H.; HUIZINGA, T. W.; SCHREUDER, G. M.; BREEDVELD, F. C.; De VRIES, R. R.; TOES, R. E. *An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility.* Arthritis Rheum 2005; 52: 2637-44

VERPOORT KN, *et al.* *Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles.* Arthritis Rheum 2007; 56: 3949-3952.

VOS, K. *et al.* *Evidence for protective role of the human leukocyte antigen class II region in early rheumatoid arthritis.* Rheumatology 2001; 40:133-9.

WAKITANI, S. *et al.* *The homozygote of HLA-DRB10901, not its Heterozygote, is associated with Rheumatoid Arthritis in Japanese.* Scand J Rheumatol 1998;27:381-2.

WESTEDT, M. L. *et al.* *Immunogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis 1986; 45:534-8.

WEYAND, C. M.; HICOK, K. C.; CONN, D. L.; GORONZY, J. *The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis.* Ann Intern Med 1992; 117: 801-6.

WILKENS, R. F.; NEPOM, G. T.; MARKS, C. R.; NETTLES, J. W.; NEPOM, B. S. *Association of HLA-Dw-16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians. Further evidence for the "shared epitope" hypothesis.* Arthritis Rheum 1991; 34:43-47.

WINCHESTER, R.; DWYER, E.; ROSE, S. *The genetic basis of rheumatoid arthritis: the shared epitope hypothesis.* Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:761-83.

WOODROW, J. C.; NICHOL, F. E.; ZAVIROPOULOS, G. *DR antigens and rheumatoid arthritis: a study of two populations.* Br Med J 1981;283:1287-90

WORDSWORTH BP, ALLSOPP, C. E. M.; YOUNG, R. P.; BELL, J. I. *HLA-DR typing using DNA amplification by the polymerase chain reaction and sequential hybridization to sequence-specific oligonucleotide probes.* Immunogenetics 1990; 32: 413-8.

WORDSWORTH BP. *et al.* *HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis.* Am J hum Genet 1992; 51: 585-91.

WOULFE SL, *et al.* *Negatively charged residues interacting with the p4 pocket confer binding specificity to DRB1*0401.* Arthritis Rheum 1995; 38: 1744-53.

YAMADA, R.; YAMAMOTO, K. *Mechanisms of disease: genetics of rheumatoid arthritis- ethnic differences in disease-associated genes*. Nat Clin Pract Rheumatol 2007; 3: 644-50.

YELAMOS, J.; GARCIA-LOZANO, J. R.; MORENO, I. *Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population*. Arthritis Rheum 1993; 36: 811-4.

ZALESKY, M. B.; *Cell-surface molecules in the regulation of immune responsiveness*. Immunol Invest 1991; 20:103-31.

ZANELLI, E.; GONZALEZ-GAY, M. A.; DAVID, C. S. *Could HLA-DRB1 be the protective focus in rheumatoid arthritis?* Immunol Today 1995; 16:274-8.

ZANELLI, E.; BREEDVELD, F. C.; De VRIES, R. R. *HLA class II association with rheumatoid arthritis: facts and interpretations*. Hum Immunol 2000; 61:1254-61

ZVAIFLER, N. J. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: McCARTY, D. J. *Arthritis and allied conditions*. 11. ed. Philadelphia-London. Lea & Febiger, 1989.