

Este exemplar corresponde à versão final da  
Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade  
de Ciências Médicas da Universidade Estadual  
de Campinas, para obtenção do título de Dou-  
tor em Medicina, na Área de Clínica Médica,  
do médico Manoel Barros Bértolo.  
Campinas, 20 de setembro de 1996.

*Costallat*  
Profa.Dra. Lilian Tereza Lavras Costallat  
Orientadora

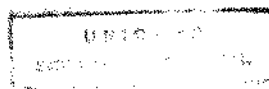
*Manoel Barros Bértolo*

**GENOTIPAGEM NA ARTRITE REUMATÓIDE. ALELOS  
HLA-CLASSE II: HLA-DRB1\*0101 E \*0102 ASSOCIADOS À  
SUSCETIBILIDADE E HLA-DRB1\*0401 E \*0404  
ASSOCIADOS À AGRESSIVIDADE**

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

**Orientador : PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> LILIAN TEREZA LAVRAS COSTALLAT**  
**Co-orientador : PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA**

**Campinas**  
**1996**



UNIDADE	PC
N.º CHAMADA	UNICAMP
	B 462 g
V.	EL
T.º DO	28872
PROC.	66796
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/10/96
N.º CPD	000040001

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

**Bertolo, Manoel Barros**

**B463g** Genotipagem na artrite reumatóide. Alelos HLA-classe II : HLA-DRB1\* 0102 associados à susceptibilidade e HLA-DRB1 \*0401 e \*0404 associados à agressividade / Manoel Barros Bertolo. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

**Orientador: Lilian Tereza Lavras Costallat**

**Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.**

**1. Artrite. 2. HLA. 3. Suscetibilidade. 4. Prognóstico. I. Lilian Tereza Lavras Costallat. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.**

## Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Aluno: Manoel Barros Bértolo

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Tereza Lavras Costallat

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

### Membros:

1.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Tereza Lavras Costallat *Liliane Costallat*

2.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clea Miranda Horta Moraes *Clea Moraes*

3.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luc Gama Soares *Luc Gama Soares*

4.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Airl Mota Simoes *Airl Mota Simoes*

5.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sílvia Cecília Botelho Costa *Sílvia Cecília Botelho Costa*

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

Data: 20/07/96

*Aos meus pais, Apolinar e Carmen.*

*aos meus filhos Beatriz e Marcos.*

*à minha esposa, Ingrid.*

## **Agradecimentos**

---

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lilian Tereza Lavras Costallat, pelo apoio, incentivo, otimismo, colaboração e valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.*

*Ao Prof. Adil Muhib Samara, grande responsável pela minha formação profissional, pelos constantes ensinamentos, oportunidades concedidas e confiança durante todos estes anos.*

*Ao Prof. Dr. João Francisco Marques Neto pelo incentivo e apoio.*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sandra Regina M. Fernandes, pela amizade sincera, disponibilidade e auxílios constantes.*

*Ao Dr. Ibsen Bellini Coimbra pelo agradável convívio e cooperação.*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Tereza Imanishi Kari, por ter me acolhido e pelos grandes ensinamentos em biologia molecular na "Tufts University".*

*Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, que me recebeu e orientou no Laboratório de Biologia Molecular.*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ligia Beatriz Persoli, pelo grande apoio no Laboratório de histocompatibilidade.*

*À Silvia Barbosa Dutra Marques, pelo auxílio no Laboratório de Histocompatibilidade.*

*A Carlos Roberto E. Grignoli, pelo apoio nas técnicas de Biologia Molecular.*

*Ao Prof. Dr. Luis Alberto Magna pelo estudo estatístico deste trabalho.*

*A todos os médicos residentes da Disciplina de Reumatologia.*

*À Seção de Apoio-Didático da FCM-UNICAMP, pelo imprescindível trabalho na elaboração final deste trabalho.*

## **SUMÁRIO**

---

RESUMO.....	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais.....	2
1.2. Imunopatogênese.....	5
1.3. Marcadores prognósticos da AR.....	6
1.4. Sistema HLA.....	7
1.5. HLA e Artrite Reumatóide.....	14
2. OBJETIVOS.....	23
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	25
3.1. Casuística.....	26
3.1.1. Pacientes.....	26
3.1.2. Exames Subsidiários.....	26
3.1.3. Critérios Diagnósticos e Classificação Funcional de Steinbrocker.....	27
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Preparação de suspensão de células mononucleares a partir do sangue periférico.....	28
3.2.2. Suspensão de células mononucleares para tipagem de antígenos HLA A e B...	29
3.2.3. Suspensão de células mononucleares enriquecidas em linfócitos B para tipagem de antígenos HLA-DR.....	29

3.2.3.1. Enriquecimento em linfócitos B através de incubação em fibra de vidro.....	29
3.2.4. Tipagem dos antígenos HLA classe I e II.....	30
3.2.4.1. Anti-soros utilizados para tipagem dos antígenos HLA.....	30
3.2.4.2. Soro de coelho.....	31
3.2.4.3. Reação de Microlinfocitotoxicidade.....	31
3.2.5. Análise Molecular.....	31
3.2.5.1. Extração de DNA.....	31
3.2.5.2. Amplificação gênica pela reação da cadeia da polimerase (PCR).....	32
3.2.5.3. Fixação do DNA amplificado em filtros de "nylon".....	34
3.2.5.4. Marcação das sondas com isótopos radioativos.....	34
3.2.5.5. Pré-hibridização.....	35
3.2.5.6. Hibridização.....	36
3.3. Método Estatístico.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Características clínicas.....	38
4.2. Distribuição dos antígenos HLA-A e HLA-B.....	41
4.3. Distribuição dos antígenos HLA-DR e DQ.....	43
4.4. Associação entre os antígenos HLA-DR e características clínicas.....	44
4.5. Distribuição dos alelos HLA-DRB1.....	46
4.6. Associação dos alelos HLA-DRB1 e características clínicas.....	57
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO.....	72



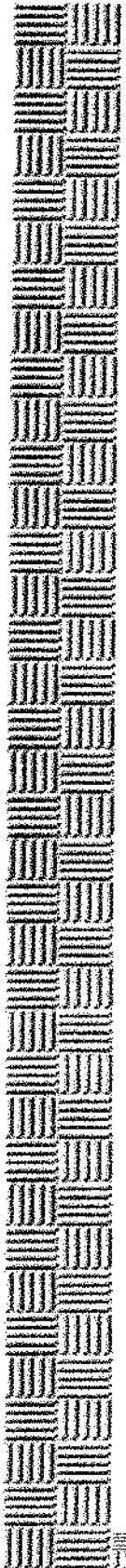
7. SUMMARY.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

### LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Figura 1. Região cromossômica do complexo HLA.....	9
Figura 2. Reconhecimento dos peptídeos pelas células T-CD4, através da apresentação pelas moléculas de classe II.....	11
Figura 3. Relação entre os sistemas de tipagem do HLA-Classe II e a nomenclatura atual do sistema HLA.....	13
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2% da amplificação do DNA de 14 pacientes positivos para DR1.....	47
Figura 5. Esquema que representa os locais de aplicação das amostras de DNA amplificadas dos pacientes com HLA-DR1 positivo.....	48
Figura 6. Hibridização alelo específica para HLA-DRB1*0101 e *0102.....	49
Figura 7. Hibridização alelo específica para HLA-DRB1*0102.....	50
Figura 8. Hibridização alelo específica para HLA-DRB1*0101 e *0103.....	51
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 2% da amplificação do DNA de 13 pacientes positivos para DR4.....	53
Figura 10. Esquema que representa os locais de aplicação das amostras de DNA amplificadas dos pacientes com HLA-DR4 positivo.....	54
Figura 11. Hibridização alelo específica para HLA-DRB1*0401.....	55
Figura 12. Hibridização alelo específica para HLA-DRB1*0404.....	56
Gráfico 1. AR: Distribuição dos títulos de FR entre os pacientes com HLA-DRB1*0401 e *0404.....	59
Gráfico 2. AR: Distribuição dos títulos de FR em 65 pacientes com HLA-DRB1*0404 positivo e negativo.....	60
Gráfico 3. AR: CFS em 65 pacientes com HLA-DRB1*0404 positivo ou negativo....	61

Gráfico 4. AR: Erosões ósseas em pacientes positivos ou negativos para as seqüências semelhantes de aminoácidos (HLA-DRB1 - *0101-*0401-0404).....	61
Quadro 1. Posição dos aminoácidos, na terceira região hipervariável das células HLA-DRB1, associados com AR.....	20
Quadro 2. Antígenos HLA de classe II-DR em diferentes populações com artrite reumatóide.....	22
Quadro 3. Critérios diagnósticos de artrite reumatóide da ACR.....	27
Quadro 4. Classificação funcional de Steinbrocker.....	28
Quadro 5. Seqüência dos “primers” utilizados para amplificação do HLA-DR4 e HLA-DR1.....	33
Quadro 6. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados como sondas para determinação dos alelos HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*01.....	35
Tabela 1. AR: Caracterização epidemiológica e clínico-laboratorial em 65 pacientes.	39
Tabela 2. AR: Manifestações extra-articulares em 65 pacientes.....	40
Tabela 3. AR: Frequência fenotípica de antígenos HLA-A em 65 pacientes.....	41
Tabela 4. AR: Frequência fenotípica de antígenos HLA-B observada em 65 pacientes.....	42
Tabela 5. AR: Frequência fenotípica de antígenos HLA-DRB1 em 65 pacientes.....	43
Tabela 6. AR: Frequência fenotípica de antígenos HLA-DQ em 65 pacientes.....	44
Tabela 7. Títulos de fator reumatóide e HLA DR4 e DR1 em 65 pacientes.....	45
Tabela 8. AR: Classificação funcional de Steinbrocker (CFS) em 65 pacientes.....	45
Tabela 9. AR: Erosões ósseas e HLA-DR4 e DR1 em 65 pacientes.....	46
Tabela 10. AR: Frequência dos alelos HLA-DRB1*01 (HLA-DRB1*0101 *0102 e *0103) em pacientes e controles.....	52
Tabela 11. AR: Frequência dos alelos HLA-DRB1*04 (HLA-DRB1*0401 0404 e 0405) em pacientes e controles.....	57

Tabela 12. AR: Alelos HLA-DRB1*01 e erosão óssea.....	58
Tabela 13. AR: Erosão óssea e alelos HLA-DRB1*04.....	59
Tabela 14. AR: Erosão óssea e HLA-DRB1*0404 em 65 pacientes.....	60



## *Resumo*

A associação de antígenos de histocompatibilidade com a artrite reumatóide (AR) vem sendo demonstrada em inúmeros estudos. A principal associação em população caucasóide é com o HLA-DR4, contudo, também vem sendo observada com HLA-DR1 e outros antígenos. Resultados de vários trabalhos sugerem que, o HLA-DR4 está mais associado com a gravidade do que com suscetibilidade. Com a introdução das técnicas de biologia molecular foi possível determinar que, os subtipos do HLA-DR4, relacionados com AR, são os alelos HLA-DRB1\*0401, \*0404 e \*0405, que estão mais associados à gravidade da doença do que com a suscetibilidade. Em alguns estudos verificou-se, também, que os subtipos do HLA-DR1 associados com a doença são os alelos HLA-DRB1\*0101 e \*0102.

Os propósitos deste estudo foram os de analisar a frequência dos antígenos HLA-DR, identificar os alelos específicos do HLA-DRB1, determinar sua frequência, correlacionar estes alelos com as manifestações clínicas e laboratoriais e caracterizar aqueles que podem predizer o padrão evolutivo da AR em pacientes caucasóides.

Foram avaliados 65 pacientes caucasóides, com AR, diagnosticados pelos critérios da "American College of Rheumatism" (ACR). Todos foram avaliados clinicamente quanto ao envolvimento articular e extra-articular. O quadro funcional foi analisado usando-se a classificação funcional de Steinbrocker (CFS). Fator reumatóide (FR) e exame radiográfico foram realizados em todos os pacientes.

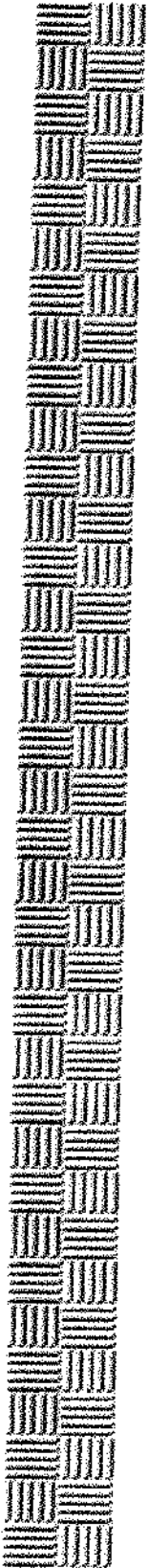
Na determinação dos antígenos de classe I e II utilizou-se a reação da microlinfocitotoxicidade. O DNA genômico dos pacientes positivos para HLA-DR1 e DR4 foi amplificado pela reação da cadeia da polimerase (PCR), e a identificação dos alelos efetuada através da hibridização de sondas de oligonucleotídeos com seqüências específicas (SSO).

Nesta casuística, o HLA mais freqüente foi o HLA-DR1 (26,2%), quando comparado com o grupo controle (11,5%) ( $p < 0,05$ ). HLA-DR4 ocorreu em 24,6% dos pacientes e em 18% dos controles ( $p > 0,05$ ). Os pacientes com HLA-DR1 não mostraram

associação com nenhuma das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas. Aqueles com DR4 positivo, quando comparados com DR4 negativo, apresentaram maiores títulos de FR, erosão óssea e um pior grau na CFS ( $p < 0,05$ ). Os alelos HLA-DRB1\*0401 e \*0404 apresentaram associação com um quadro funcional mais incapacitante, FR em altos títulos e erosão óssea, não se evidenciando predomínio significativo de um sobre o outro, com exceção do Fator Reumatóide, que estava em maiores títulos nos pacientes com o alelo \*0404. Os alelos HLA-DRB1\*0101 e \*0102, embora mais freqüentes, não apresentaram associação com as variáveis clínicas e laboratoriais.

Os pacientes com HLA-DRB1\*0401, \*0404 e \*0101, que possuem seqüências semelhantes de aminoácidos na região 70-74 (QKRRA - QRRAA), mostraram maior freqüência de erosões.

A partir dos dados obtidos, concluímos que os alelos HLA-DRB1\*0101 e \*0102 estavam relacionados com a suscetibilidade na AR, enquanto que os alelos HLA-DRB1\*0401 e \*0404 estavam associados com doença mais agressiva.



## ***1. Introdução***

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica, sistêmica, de etiologia desconhecida, que leva a uma poliartropatia geralmente simétrica, resultando em dano à cartilagem e áreas vizinhas ao osso. Por sua característica crônica e progressiva, tende a evoluir para deformidades articulares, com importante perda funcional em poucos anos, embora alguns pacientes possam apresentar remissões espontâneas (SAMARA & MARQUES NETO, 1985).

A prevalência da AR em estudos epidemiológicos realizados no exterior, varia entre 1 e 6% (ALARCON, 1995). A mais comumente citada na literatura, é de 1% da população (LINOS et al., 1980), e as mais altas têm sido encontradas entre indígenas americanos (Yakima, Chippewa e Pima), nos quais as prevalências atingem níveis de até 6% da população (WILKENS et al., 1976; HARVEY, et al., 1981; DEL PUENTE, et al., 1989). 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 nos anos sessenta era de 26 casos para 10.000 habitantes (O'SULLIVAN, CATHCART, BOLZAN, 1968). Estudo realizado por LINOS et al. (1980), encontrou incidência de dois a quatro casos para 10.000 habitantes, sugerindo um declínio da ocorrência de AR. Tais dados, porém, não foram confirmados em trabalho recente, que verificou, também, incidência ao redor de 26 casos para cada 10.000 habitantes (CHAN et al., 1993).

A doença pode ocorrer em qualquer idade e sua incidência aumenta com o passar dos anos, sendo que, o pico da está entre a quarta e sexta décadas. As mulheres são afetadas duas a três vezes mais que os homens (ZVAIFLER, 1989; SCHAARDENBURG & BREEDVELD, 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 recentemente avaliados através de estudos de imunogenética e biologia molecular (KLARESKOG, RONNELID, HOLM, 1995).

Vírus e bactérias, há longo tempo, têm sido suspeitos de desencadearem o processo da AR. Numerosos patógenos como: *mycoplasma*, *clostridium*, *proteus*, retrovírus e o vírus de Epstein-Barr têm sido relacionados à patogenia da AR, porém, nenhum achado consistente confirma que estes microrganismos estejam relacionados com o seu desenvolvimento (SPECTOR, 1990). 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).

A participação de fatores genéticos é evidenciada por estudos em gêmeos monozigóticos, variando a concordância da frequência da artrite reumatóide de 10 a 30%, sendo que, em irmãos não gêmeos esta incidência é muito menor (LAWRENCE & BALL, 1958). Existe uma grande concordância de AR em gêmeos idênticos, homozigóticos, com o antígeno de leucócitos humanos HLA-DR4, conferindo um aumento na suscetibilidade à AR (JAWAHEER et al., 1994). Essa concordância da frequência foi encontrada, principalmente, em pacientes com padrão de doença agressiva, sugerindo que fatores genéticos estão mais associados com a gravidade da artrite reumatóide do que com a suscetibilidade absoluta para a enfermidade (WEYAND et al., 1992). A herança do gene que determina suscetibilidade à AR, parece ser recessiva (EVANS et al., 1995), embora alguns estudos demonstrem ser dominante (YAMASHITA, KHAN, KUSHNER, 1986; TANEJA et al., 1993) ou ainda inconclusiva (PAYAMI, 1986).

Dois marcadores têm sido claramente associados com a artrite reumatóide: o fator reumatóide (FR) e os alelos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), no homem, designado como sistema HLA (CALIN, ELSWOOD, KLOUDA, 1989; AHO, PALUSUO, KURKI, 1994; NELSON et al., 1994). Os pacientes com artrite reumatóide

têm uma frequência maior do antígeno HLA-DR4 e do FR, quando comparados ao grupo controle (JARAQUEMADA et al., 1986). Originalmente a especificidade HLA-DR4, detectada sorologicamente, foi associada à maior suscetibilidade à doença (STASTNY, 1976), contudo, tem sido demonstrado que a associação é maior em pacientes com doença grave e progressiva. Quanto ao FR, também há relação entre este e enfermidade grave e progressiva (MORENO et al., 1996; VAN ZEBEN & BREEDVELD, 1996).

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, FEINGENBAUM, CHATTERTON, 1995). A participação dos hormônios sexuais na AR é reforçada, principalmente, com o controle melhora da atividade da doença, durante a gravidez (CECERE & PERSELIN, 1981) e com o efeito protetor dos contraceptivos orais na ocorrência da doença (SPECTOR & HOCHBERG, 1990; HANNAFORD, KAY, HIRSCH, 1990).

Estudos demonstraram que, homens com AR apresentam tendência para níveis de testosterona diminuídos. CUTOLO et al. (1988), avaliou o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal em homens com artrite reumatóide e encontrou níveis baixos de testosterona e deidrotestosterona devido a uma hipofunção testicular. Homens portadores de AR podem ter níveis diminuídos de testosterona em consequência do uso de corticóides, mesmo quando administrados em baixas doses (MARTENS et al., 1994). Alelos do sistema HLA parecem agir como marcadores para baixos níveis de testosterona (OLLIER, SPECTOR, SILMAN, 1989).

## 1.2. IMUNOPATOGENESE

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). NAGASHIMA et al. (1995), demonstraram que, o fator de crescimento do endotélio vascular é sintetizado e liberado por um grande número de macrófagos da subsinóvia, fibroblastos e células da sinóvia, podendo estimular a proliferação endotelial na AR.

Muitas células T-CD4 foram vistas dentro da sinóvia inflamada, sendo que, os linfócitos T da sinóvia estavam ativados, julgando-se pela expressão dos marcadores de ativação da superfície celular (KLARESKOG et al., 1982). Em estudos de membrana sinovial reumatóide, foi demonstrada a presença de citocinas, tais como: Intérféron gama (INF-G), e as interleucinas (IL) IL2, IL4, IL10 e IL12, liberadas pelos 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. Recentemente, RONNELID et al. (1994), demonstraram que anticorpos IgG contra o auto antígeno da cartilagem, colágeno tipo II, eram produzidos na maioria dos pacientes com AR que possuíam, na superfície celular, a molécula HLA-DR4, mas em nenhum dos indivíduos sem esta molécula. É lógico considerar que, o colágeno tipo II pode ser um antígeno patogênico em alguma fase da artrite, o que dependerá da presença das moléculas do CPH.

GREGERSEN (1992), acredita que a AR é iniciada por um patógeno não identificado, 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 a ausência ou persistência da exposição ao patógeno, os linfócitos T continuarão a responder aos antígenos próprios, o que perpetua o processo inflamatório.

O reconhecimento imunológico pelas células T requer a formação do complexo trimolecular, constituído pelos receptores das células T (TCR), moléculas do 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., 1978).

### **1.3. MARCADORES PROGNÓSTICOS DA AR**

O prognóstico da AR não é uniforme, pois existem subgrupos de pacientes com evolução variável (PINCUS & CALLAHAN, 1993) e poucos marcadores prognósticos permitem uma estratificação dos pacientes (GORDON, STEIN, BRODER, 1973).

A destruição articular, na maioria dos casos, ocorre nos primeiros anos da doença, o que gerou a tendência atual de tratar os pacientes com AR mais precoce e agressivamente (FUCHS et al., 1989). A partir deste fato, tornou-se necessário descobrir marcadores prognósticos para a doença agressiva, o que permitiria uma terapêutica melhor definida. Como os fatores genéticos têm atraído muita atenção neste sentido, alguns estudos prospectivos em AR inicial têm incluído a identificação dos antígenos HLA como marcadores de prognóstico (PAULUS & BULPITT, 1995). EBERHARDT et al. (1993),

observaram a evolução de 98 pacientes com artrite reumatóide inicial, seguidos durante dois anos, associando-os com o antígeno do sistema HLA. O antígeno HLA-DR4, detectado por sorologia, foi significativamente mais comum nestes pacientes, porém, não houve associação significante com a positividade do fator reumatóide e nem com dano articular progressivo em pequenas juntas. Ocorreu, também, uma associação entre a positividade do HLA-DR4 e alterações destrutivas das articulações coxofemorais e dos ombros. Os nódulos subcutâneos também foram mais observados nos pacientes HLA-DR4 positivos. Alguns estudos divergem quanto à associação entre HLA-DR4 e FR. JARAQUEMADA et al. (1986), encontraram alta frequência de HLA-DR4 em pacientes positivos quanto ao fator reumatóide, quando comparados com os negativos, sendo isto mais evidente naqueles que apresentavam altos títulos de fator reumatóide. OLSEN et al. (1988) demonstraram que, o HLA-DR4 estava associado significativamente com a presença do FR e com alterações radiográficas mais graves, enquanto CALIN et al. (1989) não encontraram diferenças quanto à presença de HLA-DR4 em pacientes com ou sem fator reumatóide.

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 (TIWARI & TERESAKI, 1985).

#### 1.4. SISTEMA HLA

O sistema HLA ("Human Leukocyte Antigens") 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. Reconhecem-se estas moléculas como elementos capitais na interação entre células no decorrer de qualquer resposta imune (DAUSSET, 1985).

Os genes responsáveis pela codificação dos antígenos HLA localizam-se no complexo ou região HLA, que corresponde a um pequeno segmento cromossômico, no braço curto do cromossomo 6 humano (TROWSDALE et al., 1985). Nesta mesma região, além dos genes HLA, há outros que codificam para componentes do sistema complemento (C2, C4A, C4B, BF), enzimas (por exemplo, 21 hidroxilase), fator de necrose tumoral (TNF), HSP70 (proteínas do choque térmico), genes do transporte de proteínas (TAP1, TAP2) e genes da degradação de proteínas (LMP2, LMP7) (NEPOM & NEPOM, 1995). Provavelmente, muitos genes ainda serão descobertos, relacionados tanto a funções imunológicas, como não imunológicas.

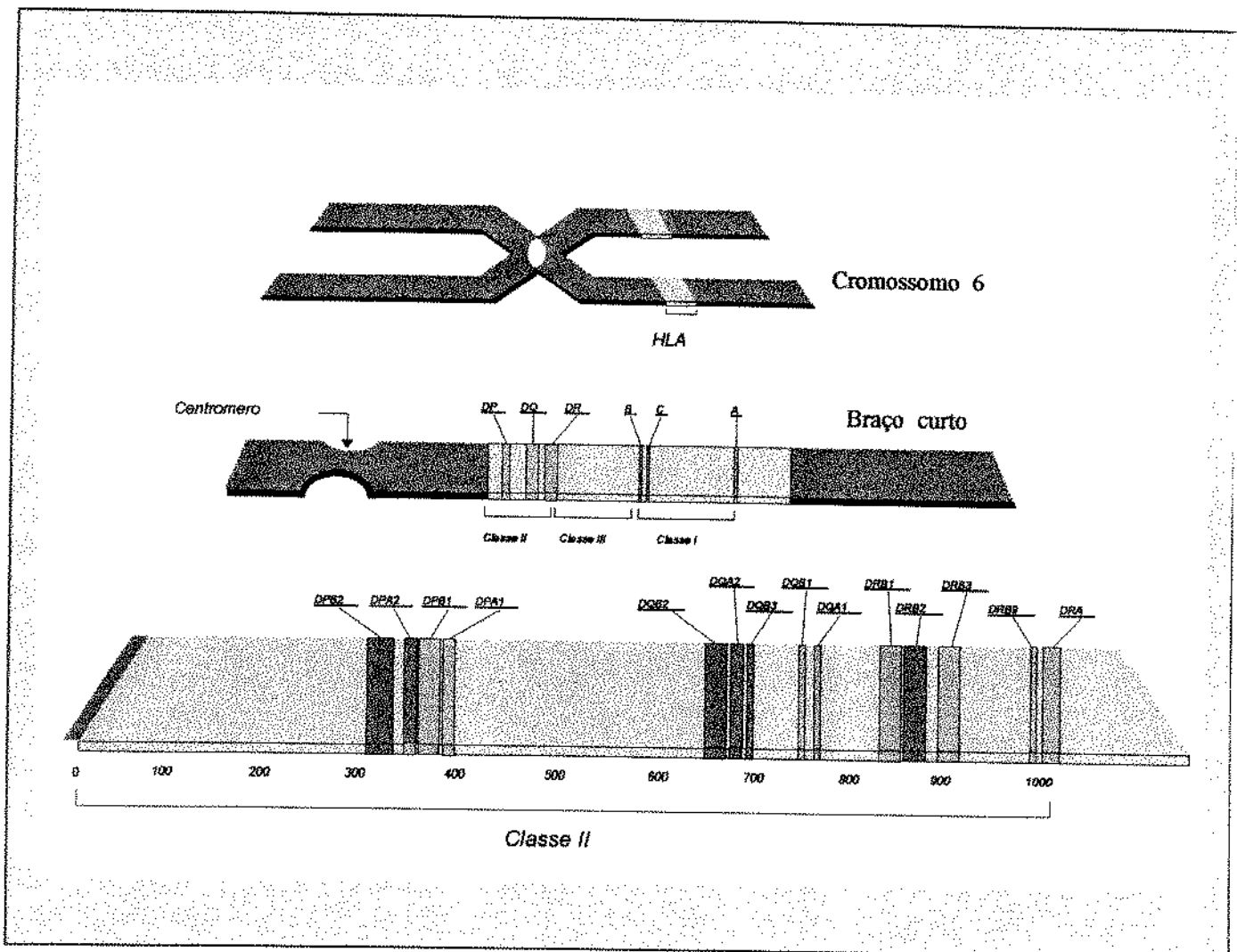
Os genes HLA classe I (genes A,B,C) e II (genes DR,DQ,DP) codificam para glicoproteínas de superfície celular que correspondem aos antígenos HLA classe I (A,B e C) e HLA classe II (DR, DQ e DP), respectivamente. A organização dos genes classe I, II e III na região HLA está representada na figura 1 (CAMPBELL & TROWSDALE, 1993).

As moléculas de HLA classe I estão presentes em praticamente todas as células nucleadas do organismo. As moléculas de HLA de classe II são encontradas principalmente em células imunocompetentes, linfócitos B, células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e em linfócitos T ativados (STRACHAN, 1987).

As moléculas de classe I são constituídas por uma cadeia alfa (44.000 daltons), polimórfica, codificada pelo CPH, associada não covalentemente à  $\beta$ 2-microglobulina (17.000 daltons), não polimórfica e codificada por genes do cromossomo 15 (BJORKMAN & PARHAM, 1990).

**FIGURA 1 : Região cromossômica do complexo HLA**

**(CAMPBELL & TROWSDALE, 1993)**



As moléculas de classe II são um heterodímero constituído por duas cadeias glicoprotéicas, uma cadeia alfa (34.000 daltons) e uma cadeia 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 região intracelular hidrofílica. A região hidrofílica extracelular da cadeia alfa contém dois domínios (resíduos 1 a 84 e 85 a 178), designados de alfa 1 e alfa 2, respectivamente. A região hidrofílica extracelular da cadeia beta também contém dois domínios (resíduos 1 a 91 e 92 a 192) designados de beta 1 e beta 2, respectivamente (BRODSKY, LEM, BRESNAHAN, 1996).

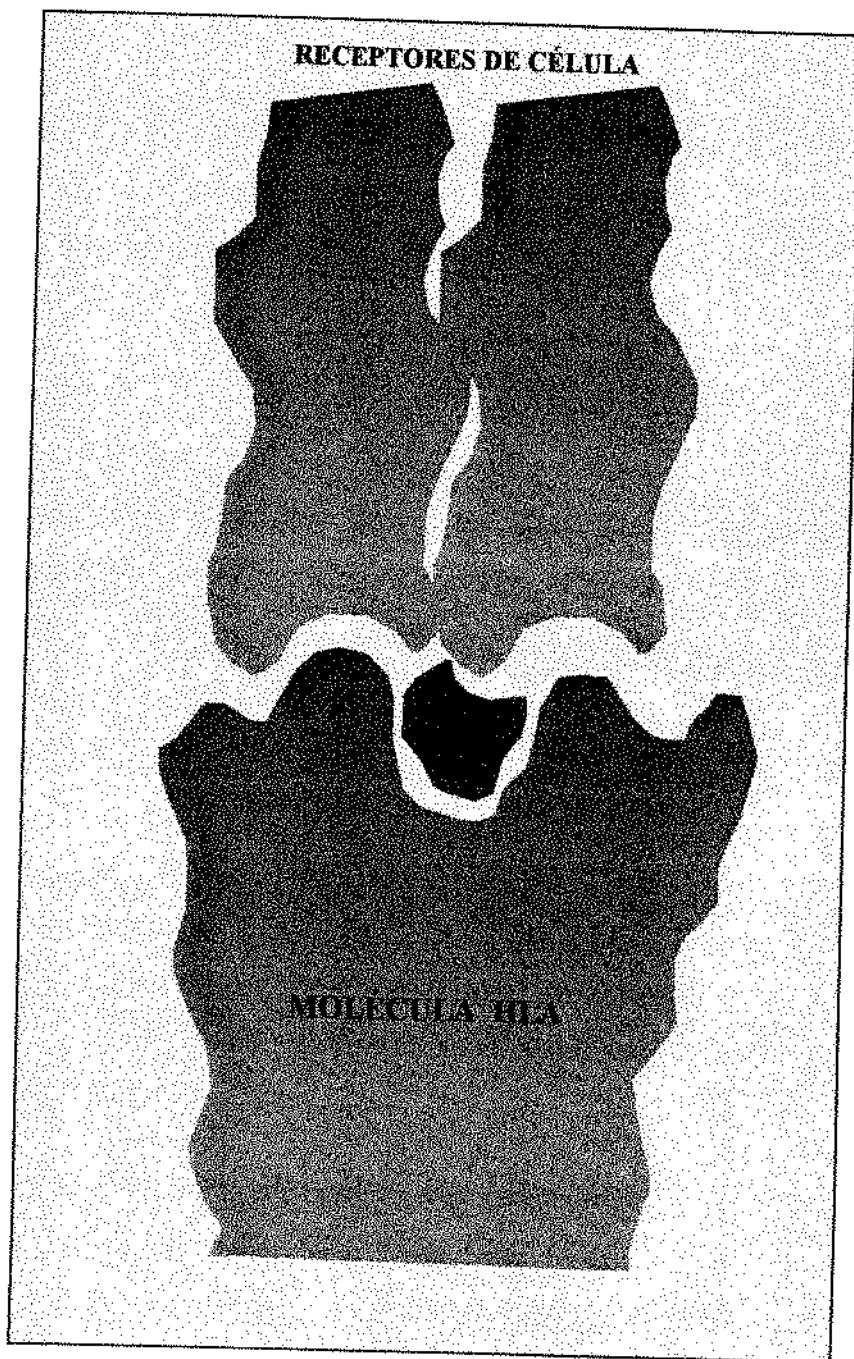
As moléculas do HLA de classe II têm um papel central na resposta imune por apresentar em fragmentos de antígenos para os linfócitos T-CD4 (ZALESKI, 1991). Citocinas podem induzir as moléculas de classe II a expressarem-se em uma variedade de células, conferindo a estas últimas, capacidade de apresentarem antígenos para linfócitos T-CD4. Através deste mecanismo, as moléculas de classe II apresentam determinados peptídeos para as células T, que são reconhecidos pelos receptores das células T-CD4, o que ativa as células B (figura2). As moléculas de classe II são, portanto, produtos dos genes da resposta imune e possuem um vasto polimorfismo (JANEWAY & 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. Os produtos gênicos dos locus HLA (antígenos HLA, A, B, C, DR e DQ) são habitualmente identificados por anticorpos específicos (reações sorológicas). As especificidades HLA-Dw são definidas por cultura de células homozigóticas (HTC) (BODMER et al., 1995).



**FIGURA 2: Reconhecimento dos peptídeos pelas células T - CD4, através da apresentação pelas moléculas de classe II.**

**(JANEWAY & TRAVERS, 1994)**

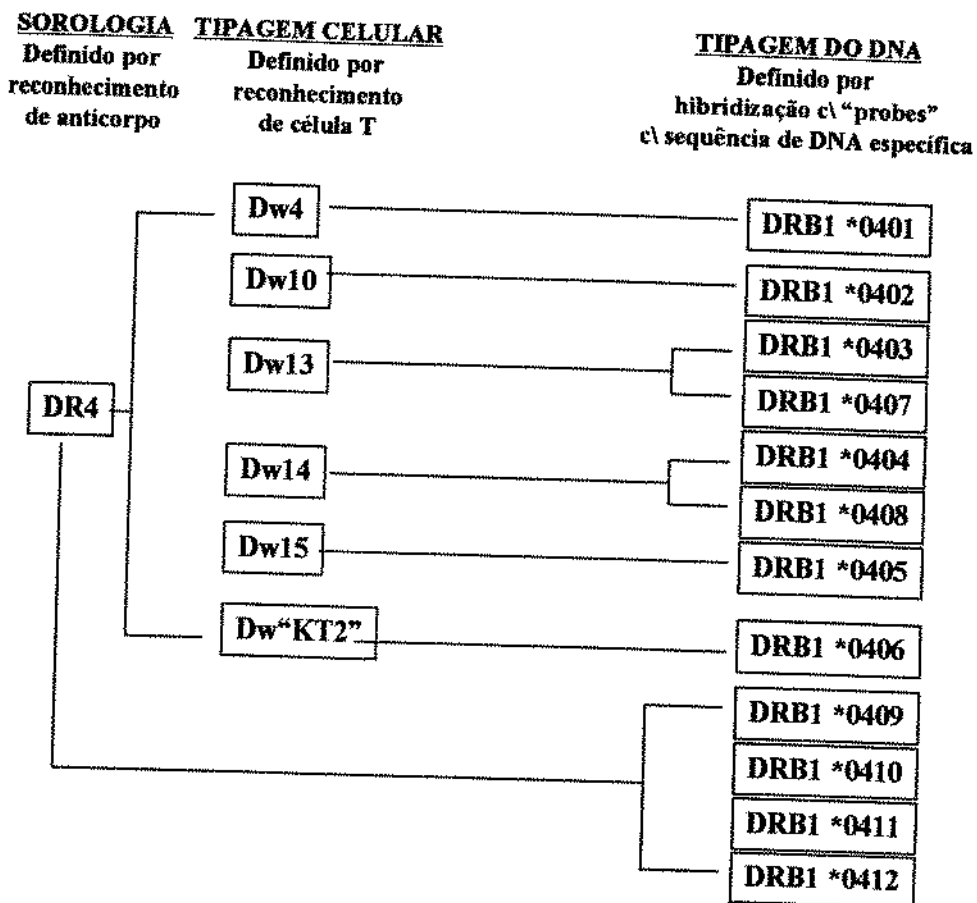


O polimorfismo do sistema HLA foi inicialmente detectado usando-se métodos celulares e sorológicos, que se tornaram limitados após a determinação das seqüências de nucleotídeos de muitos alelos deste sistema. A comparação das seqüências de todos os alelos conhecidos mostra que, aqueles associados com uma especificidade sorológica em particular, freqüentemente 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 moléculas HLA apresentam a mesma denominação pela especificidade sorológica e variam em determinadas posições, influenciando na ligação ou no reconhecimento dos peptídeos pelos receptores de células T. Sabe-se que, a especificidade HLA-DR4, detectada sorologicamente, possui 19 diferentes alelos DRB1, determinados por genotipagem, sendo conhecidos como DRB1\*0401-\*0419 e estão intimamente relacionados. Algumas destas diferenças podem ser detectadas por meio da cultura mista de linfócitos (TERMIJTELEN et al., 1991).

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 da 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 seqüências polimórficas que, por sua vez, distinguem um alelo ou grupo de alelos de outros grupos (seqüência específica de oligonucleotídeos - PCR SSO) (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 (BODMER, et al., 1995). Consistem 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. Por exemplo, o alelo HLA-DRB1\*0403 pertence ao locus HLA-DRB1 e está associado à especificidade sorológica HLA-DR4 (Figura 3).

**FIGURA 3 - Relação entre os sistemas de tipagem do HLA - Classe II e a nomenclatura atual do sistema HLA (NEPOM & NEPOM, 1995)**



## 1.5. HLA E ARTRITE REUMATÓIDE

A demonstração, na década de 1960, de que a suscetibilidade a certas leucemias em camundongos era controlada por genes do MHC, inspirou a realização de estudos, no homem, sobre associação entre doenças e antígenos HLA. O relato, em 1973, da extraordinária associação entre HLA-B27 e espondilite anquilosante representa um marco histórico no estudo de genes de suscetibilidade a doenças e complexo HLA.

Os trabalhos pioneiros de SCHLOSSTEIN et al. (1973) e BREWERTON et al. (1973), mostraram frequência do antígeno HLA-B27 de 88 a 96% nos pacientes, enquanto a frequência deste antígeno, observada em indivíduos controles, foi de apenas 4 a 8%. A partir destes achados, numerosos trabalhos foram realizados abrangendo as mais diversas patologias (TIWARI & TERASAKI, 1985).

As doenças associadas a antígenos do sistema HLA possuem várias características comuns, tais como, causa e mecanismo fisiopatológico desconhecidos, associação a anormalidades imunológicas e um 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. Essas diferenças entre alelos do HLA resultam na qualificação para os peptídeos unirem-se ao sítio de ligação do sistema HLA. 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 seqüências específicas de aminoácidos, os quais podem ser semelhantes em um grande número de alelos (hipótese do epítipo 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 (fig.3) (HARRIS, 1990; WOULFE, 1995).

STASTNY, (1976) demonstrou, em cultura de células homozigóticas (HTC), que a frequência do antígeno HLA-Dw4 estava significativamente aumentada em pacientes com AR. Posteriormente, através de tipagem sorológica, foi observada maior frequência do aloantígeno HLA-DRw4, em pacientes com fator reumatóide positivo (70%), quando comparados com indivíduos normais (28%). A especificidade para o antígeno HLA-Dw4 ocorreu em 54% dos pacientes caucasóides com fator reumatóide positivo, e em apenas 16% no grupo controle (STASTNY, 1978).

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; OLSEN et al., 1988; WESTEDT et al., 1986; GOUGH et al., 1994). O método de estudo empregado foi o de associação, isto é, as frequências dos antígenos HLA foram comparadas entre pacientes e indivíduos controles do mesmo grupo étnico. Contudo, trabalhos demonstraram que, nem todos os grupos raciais apresentaram associações com o antígeno HLA-DR4. Outras associações já foram verificadas na AR, como com o HLA-DR1 em pacientes asiáticos residentes no Reino Unido (NICHOL & WOODROW, 1981), em israelitas com HLA-DR1 e DR10 (SCHIFF et al., 1982; GAO et al., 1990a). Em japoneses existe associação entre HLA-DR4 e AR, sendo também demonstrada forte relação com AR mais agressiva (OHTA et al., 1982), em índios Yakima nos Estados Unidos, com Drw6 (WILKENS et al., 1982) e posteriormente com a variante DRB1\*1402 (WILKENS et al., 1991), em chilenos com DR9 (MASSARDO et al., 1990), nos árabes do Kwait com DR3 (SATTAR et al., 1990).

Em um estudo recente, em crianças brasileiras com ARJ, foi observado que o antígeno HLA-DR5 estava fortemente associado com a doença, considerada como um todo, não sendo notado diferença estatística significativa, quando se analisou os diferentes subtipos (GUAL et al., 1996).

A associação da especificidade HLA-DR1 com AR foi confirmada em diferentes populações, incluindo as de Israel (SCHIFF et al., 1982); Inglaterra (STASTNY et al., 1988); Espanha (SANCHEZ, MORENO, MAGARINO, 1990), e Ásia (OLLIER, et al., 1991).

A associação entre AR, FR negativo e HLA-DR1 foi demonstrada por BARDIN et al. (1985), porém, em estudo anterior, SCHIFF et al. (1982), demonstrou que existia relação entre AR e HLA-DR1 nos pacientes com FR positivo. Outro estudo realizado por GAO et al. (1990b) demonstrou que, o HLA-DR1 estava associado apenas a risco relativo de desenvolvimento de AR.

THOMSON et al. (1993), avaliando casos novos de artrite inflamatória em comunidade no Reino Unido, não encontraram um aumento da frequência dos antígenos HLA-DR4 e HLA-DR1 nos casos diagnosticados como AR, quando comparados com a população controle. No entanto, nos casos de poliartrite inflamatória indiferenciada observaram aumento da frequência de HLA-DR1. Estes resultados apóiam a hipótese de que os antígenos HLA-DR4 e HLA-DR1 são mais importantes como marcadores de doença mais agressiva e persistente, do que como marcadores para suscetibilidade à doença. Tais resultados são, também, confirmados por inúmeros estudos que demonstraram que, o antígeno HLA-DR4 é um marcador de doença mais grave (YOUNG et al., 1984; OLSEN et al., 1988; CALIN et al., 1989).

Esses achados demonstram que, alguns alelos estão primariamente associados à AR em uma determinada população, mas não em outra, o que pode ser explicado pela diferente frequência dos alelos nas populações comparadas (OLLIER & THOMSOM, 1992).

Com a implantação de técnicas de tipagem genômica de HLA, foi possível determinar os diferentes alelos do locus HLA-DRB1, o que significou um enorme progresso, desencadeando numerosos trabalhos com a finalidade de identificar os alelos específicos do locus HLA-DRB1, que estão associados à AR, em diversas populações.

NEPOM et al. (1986) estudando os subtipos do HLA-DR4 na AR, encontraram aumento da frequência do subtipo HLA-DRB1\*0401 e do HLA-DRB1\*0404, enquanto GAO et al. (1990b) observaram aumento da frequência do subtipo HLA-DRB1\*0401.

Na população de Taiwan e da Coréia, com AR, a prevalência do HLA-DR4 é significativamente maior que na de controle, e está associada à presença de erosões ósseas, sendo que, o alelo HLA-DRB1\*0405, é o mais comum (YEN et al., 1995; KIM et al., 1995).

As seqüências dos aminoácidos dos subtipos HLA-DRB1\*0401 e HLADRB1\*0404 diferem de outros alelos, particularmente na seqüência 67 - 74. Esta seqüência, a qual se tornou conhecida como epítipo semelhante ("shared epitope"), codifica uma unidade funcional distinta, cujas propriedades imunológicas são alteradas por mudanças dos aminoácidos chaves dentro desse epítipo (HIRAIWA, YAMANAKA, KWOK, 1990).

Após inúmeros trabalhos em população caucasóide, utilizando-se sondas de oligonucleotídeos a fim de identificar as variantes do HLA-DR4, ficou demonstrado que, os alelos de suscetibilidade à AR são: DRB1\*0401 e DRB1\*0404 (NEPOM et al., 1989; WOODSWORTH et al., 1989; RONNINGEN et al., 1990; GAO et al., 1990b). NEPOM & NEPOM (1992), compararam quatro estudos em população caucasóide com AR, e verificaram associação predominante com HLA-DRB1\*0401, sendo que, mais da metade dos pacientes foram positivos para este alelo. A prevalência do alelo de suscetibilidade HLA-DRB1\*0404 também estava elevada, em três dos quatro estudos, variando de 26 a 37% em pacientes com AR, quando comparados com a frequência no grupo controle, que foi de 5 a 7%. O quarto estudo não encontrou aumento de HLADRB1\*0404. Em um estudo através de metanálise, realizado entre os índios Pima e Tohono O'odhan (Pimans) da comunidade indígena do Arizona (Estados Unidos) e que apresentam uma das mais altas taxas de prevalência de AR, foi encontrada associação significante entre os haplótipos DRB1\*1402, DQA1\*0501, DQB1\*0301, DRB3\*0101 e AR (WILLIAMS et al., 1995).

Na artrite reumatóide juvenil (ARJ), forma poliarticular e fator reumatóide positivo, também foi verificada alta prevalência dos mesmos genes de suscetibilidade HLA-DRB1\*0401 e HLA-DRB1\*0404, sendo o alelo HLA-DRB1\*0401 o mais prevalente (VEHE, BEGOVICH, NEPON, 1990). Nos pacientes com AR, FR negativo e erosões, foi encontrado apenas um discreto aumento na prevalência de HLADRB1\*0401, enquanto naqueles com AR, FR negativo, sem erosões e com manifestações leves da doença, a prevalência do HLA-DRB1\*0401 estava igual ao do grupo controle (NEPON et al, 1989).

A prevalência de dois alelos suscetíveis, em um único indivíduo, confere maior suscetibilidade genética na AR. Os dois alelos do antígeno HLA-DR4 associados à AR são: HLA-DRB1\*0401 e HLA-DRB1\*0404. As possíveis associações desses alelos entre si podem ser: HLADRB1\*0401-\*0404; \*0401-\*0401; \*0404-\*0404. Na ARJ, fator reumatóide positivo, nos adultos com AR, fator reumatóide positivo e lesão erosiva, existe maior número de pacientes com os dois alelos de suscetibilidade, principalmente na ARJ (NEPOM et al., 1989; VEHE et al., 1990). WEYAND et al. (1991) sugerem que, a associação dos alelos de suscetibilidade HLA-Dw4 (HLA-DRB1\*0401) e HLA-Dw14 (HLADRB1\*0404), pode ter um efeito cumulativo relacionando-se à AR mais agressiva. Os mesmos autores, um ano depois, comprovaram que pacientes homocigotos para HLA-DR4 ou com alelos apresentando seqüências semelhantes na região 70-74, têm doença articular e extra-articular mais agressiva. Os pacientes deste estudo eram todos caucasóides, fator reumatóide positivo e com erosões ósseas no início da doença, representando um subtipo mais grave de AR (WEYAND et al., 1992). WORDSWORTH et al. (1992); TODA et al. (1994), demonstraram que combinações entre os alelos do HLA-DR (HLA-DRB1\*0401, \*0404, \*0405 e \*0101), predispõem a uma doença mais agressiva, sugerindo que mecanismos sinérgicos estejam envolvidos para determinar a agressividade na AR.

A prevalência dos marcadores HLADRB1\*0401 e HLADRB1\*0404 em pacientes com positividade para o fator reumatóide e com doença mais agressiva e erosiva, sugere que estes alelos podem ser usados como fatores prognósticos do curso da doença. Particularmente em pacientes com doença mais recente, antes do início de erosões, seria



altamente desejável identificar aqueles destinados a ter uma evolução progressiva e agressiva, pois seriam candidatos a uma forma mais incisiva de tratamento. A confirmação desta hipótese e suas aplicações ainda devem ser feitas através de estudos clínicos prospectivos. O estudo de WORDSWORTH et al. (1992) sugere um risco relativo de três, para desenvolver a doença, se apenas um alelo DRB1\*01 estiver presente e, um risco relativo de quase 50, se os dois alelos DRB1\*0401 e \*0404 estiverem presentes. Estas associações são mais evidentes naqueles com doença mais grave, principalmente quando as erosões estão presentes. Esta correlação do fenótipo e do genótipo da doença, sugere um efeito adicional dos dois haplótipos no mecanismo patogênico, levando a manifestações clínicas da doença (WEYAND, McCARTHY, GORONZY, 1995).

MacGREGOR et al. (1995), examinaram pacientes com AR, e o locus HLA-DRB1, não selecionados com relação a gravidade da doença, tendo como objetivos: investigar a associação entre alelos do loco HLA-DRB1 e suscetibilidade para AR em geral, e estudar a influência deste locus quanto a idade, sexo e variáveis da agressividade da doença. Nos pacientes com alelos que apresentavam seqüências de aminoácidos semelhantes, o risco para o desenvolvimento de AR foi de quatro vezes e, naqueles carregando dois alelos iguais, de oito vezes, quando comparados com indivíduos sem alelos em comum. O risco foi maior ainda, nos pacientes com dois alelos diferentes, mas com seqüência de aminoácidos semelhantes, sendo o risco 26 vezes maior, com os alelos HLA-DRB1\*0401/\*0404, estando os homens jovens, portando a doença mais agressiva, mais relacionados a este genótipo.

Está evidente, após vários estudos, que os subtipos HLA-DRB1\*0401; \*0404 e \*0405 conferem suscetibilidade para a AR (NEPOM et al., 1989; WORDSWORTH et al., 1989; GAO et al., 1990b). Esses subtipos diferem na seqüência de aminoácidos da molécula de HLA, que forma uma das hélices alfa nos sítios de ligação (BROWN et al., 1988). Além disto, os subtipos ou variantes HLA-DR4, associados à AR, compartilham na terceira região hipervariável, uma seqüência de aminoácidos similar, nas posições 70 - 74, denominada QKRAA ou QRRAA (Q=glutamina, K=lisina, R=arginina, A=alanina), da

cadeia DR beta (OLLIER & THOMSON, 1992). A hipótese de que a seqüência QKRAA/QRRAA está especificamente envolvida na AR tem sido reforçada pela descoberta de moléculas HLA não DR4, que também apresentam esta seqüência em pacientes com AR (Quadro 1). HLA-DR1, DR14(6), Dw16 estão associados com AR em diferentes grupos étnicos e, estes alelos contêm a seqüência QRRAA na posição 70-74, evidenciando, portanto, seqüências semelhantes (WOODROW, NICHOL, ZAVIROPOULOS, 1981; GREGERSEN, SILVER, WINCHESTER, 1987; WINCHESTER, DWYER, ROSE, 1992).

### QUADRO 1

Posição dos aminoácidos, na terceira região hipervariável das células HLA-DRB1, associados com AR.

Alelos HLA-DRB1	Posição dos aminoácidos				
	70	71	72	73	74
*0101	Q	R	R	A	A
*0401	Q	K	R	A	A
*0404	Q	R	R	A	A
*0405	Q	R	R	A	A

A alta freqüência do alelo HLA-DRB1\*0401 foi demonstrada em pacientes com AR soropositivos, enquanto que nos soronegativos foi encontrada maior freqüência de HLA-DRB1\*0404 e \*0101. A posição dos aminoácidos na região 70 a 74 é idêntica para

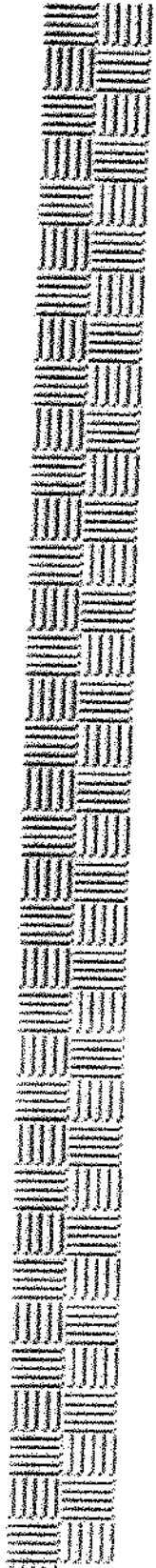
HLA-DRB1\*0404 e DRB1\*0101, com predomínio da seqüência QRRAA, com arginina na posição 71, enquanto para o HLA-DRB1\*0401 há predomínio da seqüência QKRAA, com lisina na posição 71. A seqüência QKRAA foi raramente encontrada em pacientes soronegativos, enquanto duas seqüências de QKRAA foram observadas apenas em pacientes soropositivos. Esses resultados sugerem que, a posição 71 tem um papel na indução da produção do fator reumatóide, o que subsequente relaciona-se à doença mais rápida e mais agressiva (WEYAND et al., 1995).

Pelas diferenças já demonstradas em estudos de vários grupos étnicos (Quadro 2), os resultados encontrados em uma população não servem como modelo para todas as populações e, deste modo, o intuito deste trabalho foi o de avaliar, no Brasil, um grupo de pacientes com artrite reumatóide e caracterizá-lo quanto à presença dos antígenos de histocompatibilidade classe II (DR) e genotipagem do locus HLA-DRB. Esta genotipagem foi efetuada através da amplificação enzimática do segundo exon polimórfico do locus HLA-DRB do DNA genômico, pela reação da cadeia de polimerase (PCR) e, correlacionando-a quando possível, com a gravidade da doença. Como os genes de suscetibilidade DRB1\*0401 e \*0404 têm sido relacionados, em outras populações, a um curso de doença mais grave, erosivo e progressivo, a genotipagem do HLA tem um importante papel no prognóstico da doença, podendo ser utilizada em pacientes com AR inicial, para ajudar a prever o curso da doença e, com esses dados, selecionar pacientes para uma forma mais agressiva de tratamento (BENSEN, et al., 1990; NEPON & NEPON, 1992; HARRIS, 1996; WOLLHEIM, 1996).

## QUADRO 2

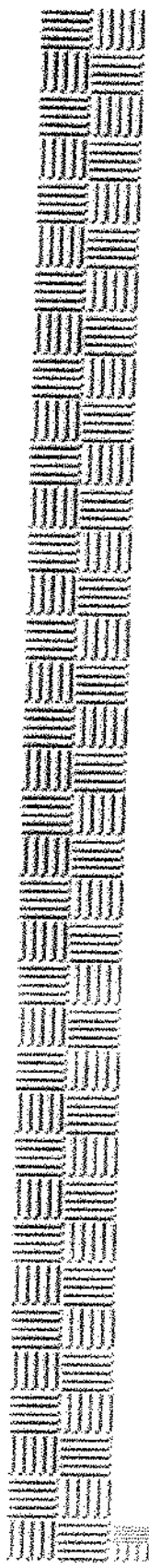
Antígenos HLA de Classe II-DR em diferentes populações com Artrite Reumatóide

População	HLA-Classe II-DR	Referências
Espanha (caucasóide)	DR1-DR4-DR10	YELAMOS et al. (1993)
Israel (caucasóide)	DR1-DR10	SCHIFF et al. (1982)
Inglaterra (asiático)	DR1	OLLIER et al. (1991)
França (Sul) (caucasóide)	DR1-DR4	BENAZET et al. (1995)
Estados Unidos (caucasóide)	DR4 (Dw4, Dw14)	NEPOM et al. (1986)
Estados Unidos (negro)	DR4 (Dw13.3)	NEPOM et al. (1989)
Coréia (oriental)	DR4 (Dw15)	MacDANIEL, ALARCON, BARGER (1990)
Taiwan (oriental)	DR4 (Dw15)	KIM et al. (1995)
Alemanha (caucasóide)	DR4	YEN et al. (1995)
Japão (oriental)	DR4	WESTEDT et al. (1986)
México (caucasóide)	DR4	OHTA et al. (1982)
Chile (caucasóide)	DR9	GORODESKY et al. (1981)
Kuwait (caucasóide)	DR3	MASSARDO et al. (1990)
Índios Yakima (EUA)	DR6	SATTAR et al. (1990)
Cingapura (oriental)	DRw53	WILLKENS et al. (1991)
		BOEY et al. (1992)



## ***2. Objetivos***

1. Determinar a frequência fenotípica dos antígenos HLA-DR em pacientes caucasóides com AR.
2. Identificar os alelos específicos do HLA-DRB1 por PCR-SSO e determinar sua frequência em pacientes caucasóides com AR.
3. Correlacionar estes alelos com as manifestações clínicas e laboratoriais destes pacientes.
4. Caracterizar os alelos capazes de predizer o padrão evolutivo da doença.



### ***3. Casuística e Métodos***

### **3.1. CASUÍSTICA**

#### **3.1.1. Pacientes:**

Foram estudados 65 pacientes, caucasóides, com diagnóstico de AR e que preencheram quatro ou mais critérios diagnósticos de propostos pela American College of Rheumatism (ACR) (ARNETT et al., 1988). Os pacientes foram acompanhados no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (HC FCM-UNICAMP).

Foi elaborada ficha clínica, contendo os dados referentes à idade, sexo, idade de início da doença, duração da doença e a avaliação quanto ao envolvimento articular e manifestações extra-articulares, presentes no exame físico, ou relatadas anteriormente no prontuário médico. As manifestações extra-articulares consideradas foram: nódulo reumatóide, fenômeno de Raynaud, serosites, vasculite cutânea, ceratoconjuntivite, neuropatia e uveíte.

Em relação ao tratamento, foram divididos em dois grupos, um grupo com tratamento considerado não agressivo (pacientes que usaram apenas anti-inflamatórios não hormonais e (ou) anti-inflamatório hormonal em baixas doses e (ou) cloroquina) e outro grupo com tratamento agressivo (a inclusão de methotrexate e/ou sais de ouro e (ou) sulfassalazina e (ou) azatioprina).

#### **3.1.2. Exames Subsidiários:**

##### **FATOR REUMATÓIDE**

O teste do fator reumatóide, pelo método de fixação do látex, foi realizado em todos os pacientes, e considerado como critério de inclusão quando os títulos estavam iguais ou acima de 1/40.



## AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA

As articulações das mãos, punhos, pés e outras também envolvidas, foram radiografadas e avaliadas quanto à presença ou ausência de erosão óssea.

### 3.1.3. Critérios diagnósticos da ACR e Classificação Funcional de Steinbrocker

A partir dos dados clínicos e laboratoriais, foram determinados o número de critérios diagnósticos da ACR (Quadro 3), presentes para cada paciente (ARNETT et al., 1988) e a classificação funcional de Steinbrocker (CFS) (Quadro 4)(STEINBROCKER, TRAEGER, BATTERMAN, 1949)

### QUADRO 3

#### Critérios diagnósticos de Artrite Reumatóide da 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 do Fator Reumatóide (FR).
7. Erosão óssea, ao exame radiográfico, e (ou) osteopenia justa-articular nas mãos ou punhos.

Os critérios um a quatro devem estar presentes, pelo menos, durante seis semanas.

AR é definida pela presença de quatro ou mais critérios.

## QUADRO 4

### Classificação funcional de Steinbrocker

1. O paciente realiza todas as atividades, sem dificuldades.
2. O paciente realiza todas as atividades, apesar de desconforto.
3. O paciente está limitado a poucas atividades, mantendo apenas as usuais.
4. O paciente está incapacitado para realizar qualquer tipo de atividade.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Preparação de suspensão de células mononucleares a partir do sangue periférico

O sangue (aproximadamente 20 ml) foi colhido em heparina (Liquemine 5000 U/ml, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, Brasil), na proporção de 0,1 ml de heparina para cada 10 ml de sangue. A seguir, o sangue foi misturado, volume a volume, com solução fisiológica e colocado sobre solução de Ficoll-Hypaque, com densidade de 1,076 (354 ml de solução a 9 g% de Ficoll 400, Pharmacia Fine Chemicals, Upsalla, Suécia), 100 ml de solução de Hypaque a 50% (Winthrop Products Inc., New York, Estados Unidos) e 47,5 ml de água destilada, sendo a densidade ajustada para 1,076 com água destilada. A proporção sangue-solução de Ficoll-Hypaque foi de aproximadamente 1:3. Após centrifugação a 200 g, por 30 minutos, foi recolhida a nuvem de células mononucleares da interface, e a mesma foi novamente suspensa em aproximadamente 6ml de solução salina balanceada de Hanks (Difco Laboratories, Detroit, Estados Unidos). Após lavagem (centrifugação a 100 g por 10 minutos) as células foram

novamente suspensas em Hanks. A viabilidade celular foi avaliada através do corante azul Tripán (Matheson, Coleman e Bell, Norwood, Estados Unidos) e, a solução a 0,25 g / 100 ml foi misturada, volume a volume, com suspensão celular.

As células mononucleares foram utilizadas imediatamente após sua preparação.

### **3.2.2. Suspensão de células mononucleares para tipagem de antígenos HLA A e B**

A suspensão de células mononucleares foi ajustada para a concentração de  $2 \times 10^6$  / ml. Em alguns casos, foi utilizada suspensão de linfócitos T, na mesma concentração, obtidos após separação dos linfócitos B, conforme descrito a seguir.

### **3.2.3. Suspensão de células mononucleares enriquecidas em Linfócitos B para tipagem de antígenos HLA-DR**

#### **3.2.3.1. Enriquecimento em linfócitos B através de incubação em fibra de vidro**

Uma fibra de vidro (Glass Fiber Filter Type A3 257 mm, Trial Pack, Gelman Sciences Inc., Ann Arbon, USA ) foi colocada em tubo de plástico de 2 cm / 11,5 cm ( 0,15 g de fibra / tubo ), ao qual foram adicionados 10 ml de solução de Hanks contendo 5% de soro fetal bovino (Gibco Europe).

Após centrifugação por 1 minuto a 200 g, o tubo foi incubado em banho-maria, a 37°C, por 30 minutos. A seguir foi introduzida no tubo uma vareta de madeira (com diâmetro de 2 mm e 14 cm de comprimento) e, através de movimentos circulares, a fibra de vidro foi enrolada na vareta, de maneira a formar um cotonete. Este, foi retirado do

tubo, e sobre a fibra de vidro foi gotejada suspensão de células mononucleares, no volume de 1 ml e com concentração máxima de  $15 \times 10^6$  células / ml de Hanks com 5 % de soro fetal bovino, previamente aquecido a 37°C. O cotonete foi, então, incubado em posição horizontal, em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos. Após a incubação, a fibra de vidro foi gotejada com 10 ml de solução de Hanks com 5% de soro fetal bovino, a 37°C, resultando na liberação de linfócitos T. A seguir, o cotonete foi introduzido em outro tubo, contendo 10 ml de solução de Hanks em 10 % de soro fetal bovino e, através de movimentos circulares foram liberados os linfócitos B. Após a separação, as suspensões de linfócitos T e B foram lavadas em solução de Hanks e a concentração foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células / ml.

### **3.2.4. Tipagem dos antígenos HLA classe I e II**

#### **3.2.4.1. ATI-soros utilizados para tipagem dos antígenos HLA**

##### **SOROS ANTI-HLA A-B:**

Foram utilizados 120 anti-soros, capazes de identificar 17 especificidades da série HLA-A (1, 2, 3, 9, 10, 11, 28, 29, 30, 31, 32, 33) e da série alélica HLA-B (5, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 27, 35, 37, 40, 41, 53). Para cada especificidade havia pelo menos dois e, em geral, três diferentes anti-soros.

##### **SOROS ANTI-HLA DR-DQ:**

Foram utilizados 60 anti-soros, capazes de identificar as especificidades da série HLA-DR 1, 2, 3, 4, 11(5), 6, 7, 10, e da série alélica HLA-DQ1, 2 e 3.

### **3.2.4.2. Soro de coelho**

Sangue de 50 coelhos Nova Zelândia, adultos e aparentemente normais, foi colhido e incubado por 30 minutos a 37°C, e por 2 horas, a 4°C. O soro foi separado em centrífuga refrigerada e guardado em alíquotas a - 80°C.

### **3.2.4.3. Reação de Microlinfocitotoxicidade**

O teste foi realizado em placas de microlinfocitotoxicidade (Falcon Plastics Division, B. D. Laboratories Inc., Los Angeles, USA), previamente preenchidas com soros anti-HLA. A cada escavação desta placa foi adicionado 1 microlitro de suspensão celular (células mononucleares totais ou linfócitos T, para tipagem HLA A e B, e linfócitos B para tipagem HLA-DR) na concentração de  $2 \times 10^6$  células / ml. As placas foram, então, incubadas à temperatura ambiente, por 30 (tipagem HLA - A, B ) ou 60 (tipagem HLA-DR) minutos. A seguir, a cada escavação foram adicionados 5 microlitros de soro de coelho, como fonte de complemento e as placas foram incubadas por mais 60 (tipagem HLA-A, B ) ou 90 ( tipagem HLA-DR) minutos, à temperatura ambiente. Ao final, a fase líquida foi desprezada por inversão da placa, e 1 microlitro de solução de azul de Tripan foi adicionado a cada escavação. A leitura das reações foi realizada após 10 a 20 minutos, em microscópio óptico.

### **3.2.5. Análise molecular**

#### **3.2.5.1. Extração de DNA:**

A extração de DNA genômico foi feita em todos os pacientes positivos para o antígeno HLA-DR1 ou HLA-DR4, a partir de 20 ml de sangue periférico, colhidos em frasco estéril, com EDTA 10% como anticoagulante. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm, por 15 minutos. Após o descarte do plasma, os eritrócitos foram lisados com uma

mistura de soluções de cloreto de amônio  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M (0,5 vezes o volume de células). Após 15 minutos, em repouso, à temperatura ambiente, o hemolisado foi centrifugado a 2500 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos, lisado em solução de NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), 4,2 g de uréia, 1ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, por 16 horas a 37°C.

Uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionada (volume a volume). Após agitação, seguiu-se centrifugação a 2500 rpm, por 20 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo estéril, repetindo-se o procedimento anterior. Uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi então adicionada (volume a volume) repetindo-se a centrifugação.

Seguindo-se à transferência da fase aquosa para um novo tubo, a precipitação do ácido nucléico foi conduzida pela adição de acetato de sódio 3M pH 5,3 (10% do volume) e etanol absoluto gelado (três vezes o volume).

O DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada, estéril e teve sua concentração estimada em espectrofotômetro, através do valor da densidade óptica em comprimento de onda = 260nm (SAMBROOK et al., 1989).

### **3.2.5.2 Amplificação gênica pela reação da cadeia da Polimerase (PCR):**

A amplificação específica do DNA genômico do HLA-DR4 foi realizada usando-se um iniciador (“primer”) da primeira região hipervariável de todos os alelos DR4B1 e sua seqüência complementar do “primer” DRB (LANCHBURY et al., 1990). O HLA-DR1 também foi amplificado com “primer” específico para os alelos DR1B1 e sua seqüência complementar do “primer” DRB (THOMSON et al. 1993) (Quadro 5). Os “primers” utilizados foram provenientes do Laboratório do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo ( antiga Escola Paulista de Medicina “EPM”).

Foi amplificado 1 µg de DNA genômico, diretamente, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo o método descrito por SAIKI et al. (1988), com algumas modificações. A reação foi realizada usando-se um ciclador de temperatura Perkin-Elmer Cetús em reações de 100 µl, contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de cloreto de potássio (KCl), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,01% de gelatina, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,1 µM de cada iniciador (“primer”) (Quadro 5) e 2 unidades de Taq polimerase (BRL). Ao volume final foram adicionados 30 µl de óleo mineral. As condições da reação consistiram em uma desnaturação inicial a 94° graus centígrados, por 5 minutos, seguida de 40 ciclos que compreendiam: desnaturação a 94°C, por 90 segundos, pareamento a 55°C, por 90 segundos e extensão a 72°C, por 120 segundos. O último ciclo teve o período de extensão prolongado por 7 minutos. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose a 2% (corado com brometo de etídio) e visualizados sob iluminação ultravioleta.

#### QUADRO 5

Seqüência dos pares de “primers” utilizados para amplificação do HLA-DR4 e HLA-DR1.

HLA-DR4	5'- TCT TGG AGC AGG TTA AAC A - 3'
	5'- TCG CCG CTG CAC TGT GAA G - 3'
HLA-DR1	5'- TTC TTG TGG CAG CTT AAG TT - 3'
	5'- CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT - 3'

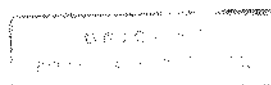
### 3.2.5.3 Fixação do DNA amplificado em filtros de "Nylon":

Foram utilizados 50 µl de DNA amplificado com os "primers" para cada amostra, acrescidos de 350 µl de solução de NaOH 0,4N e EDTA 25 mM. Após homogeneização vigorosa, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foi aquecida a 95°C por 2 minutos e colocada em gelo até ser aplicada em membranas de "nylon", por sucção a vácuo, no sistema de "Dot-Blot" (Aparato Bio-Dot - Biorad), com posterior fixação por aquecimento a 80°C por 2 horas (SAMBROOK et al., 1989; COSTA et al., 1992).

### 3.2.5.4. Marcação das sondas com isótopos radioativos:

A identificação dos alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04 foi realizada através de sondas de oligonucleotídeos que reconheçam as variantes do HLA-DR1 (THOMSON et al., 1993) e do HLA-DR4 (WORDSWORTH et al., 1990) (Quadro 6). As sondas de oligonucleotídeos utilizadas para identificação dos alelos HLA-DRB\*01 foram provenientes do Laboratório do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, e as sondas usadas para identificação dos alelos HLA-DRB1\*04 foram provenientes do "The Midland Certified Reagent Company - Texas- USA".

A reação de marcação radioativa das sondas de oligonucleotídeos foi realizada em solução contendo 10 pmoles da sonda de oligonucleotídeos (Quadro 2), 5µl de T4 polinucleotídeo quinase (USB), 8 µl ( $\gamma$ -32 P) ATP (5000 Ci/mmol; 10 µ Ci/µl Amersham), em tampão 50 mM Tris-HCL pH 7,6, 10mM MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM DTT, 0,1 mM espermidina, 0,1 mM EDTA com volume final de 50 µl (modificado de SAMBROOK et al., 1989). A mistura foi incubada a 37°C, por 2 horas, parando-se a reação com 100 µl de TNE (10mM Tris-HVL, 100mM NaCl, 1mM EDTA). Após purificação em coluna de Sephadex G50, a eficiência da marcação foi avaliada pela leitura da radioatividade de 1µl de sonda em 3ml de líquido de cintilação (contador de cintilação líquida LS 5000 TA-Beckman).





## QUADRO 6

Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados como sondas para determinação dos alelos HLA-DRB1\*04 e HLA-DRB1\*01.

### ALELOS

### SEQÜÊNCIAS

DRB1*0401	5'	GGA GCA GAA GCG GGC CGC G	3'
DRB1*0404	5'	GAG CAG AGG CGG GCC GCG	3'
DRB1*0405	5'	GCG GCC TAG CGC CGA GT	3'
DRB1*0101/0102	5'	TCC TGG AGC AGA GGC GGG	3'
DRB1*0102	5'	AAC TAC GGG GCT GTG GAG	3'
DRB1*0103	5'	ACA TCC TGG AAG ACG AGC	3'
DRB1*0101/0103	5'	AAC TAC GGG GTT GGT GAG	3'

### 3.2.5.5. Pré-hibridização

Os filtros obtidos pelo "Dot Blot" foram colocados no interior de recipientes plásticos, flexíveis, contendo 10 ml de tampão de hibridização (concentração final: 5X SSPE\*, 5X Denhardt's\*\* e 0,5% SDS\*\*\*) e incubados por 2 horas, à temperatura de 42°C.

\* SSPE 20X: 175,3g NaCl, 27,6g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 7,4g EDTA para 1000ml de água.

\*\* Denhardt's 50X: 5g Ficoll 400, 5g polivinilpirolidona, 5g BSA (soro de albumina bovina) para 500ml de água.

\*\*\* SDS: Duodecil sulfato de sódio.

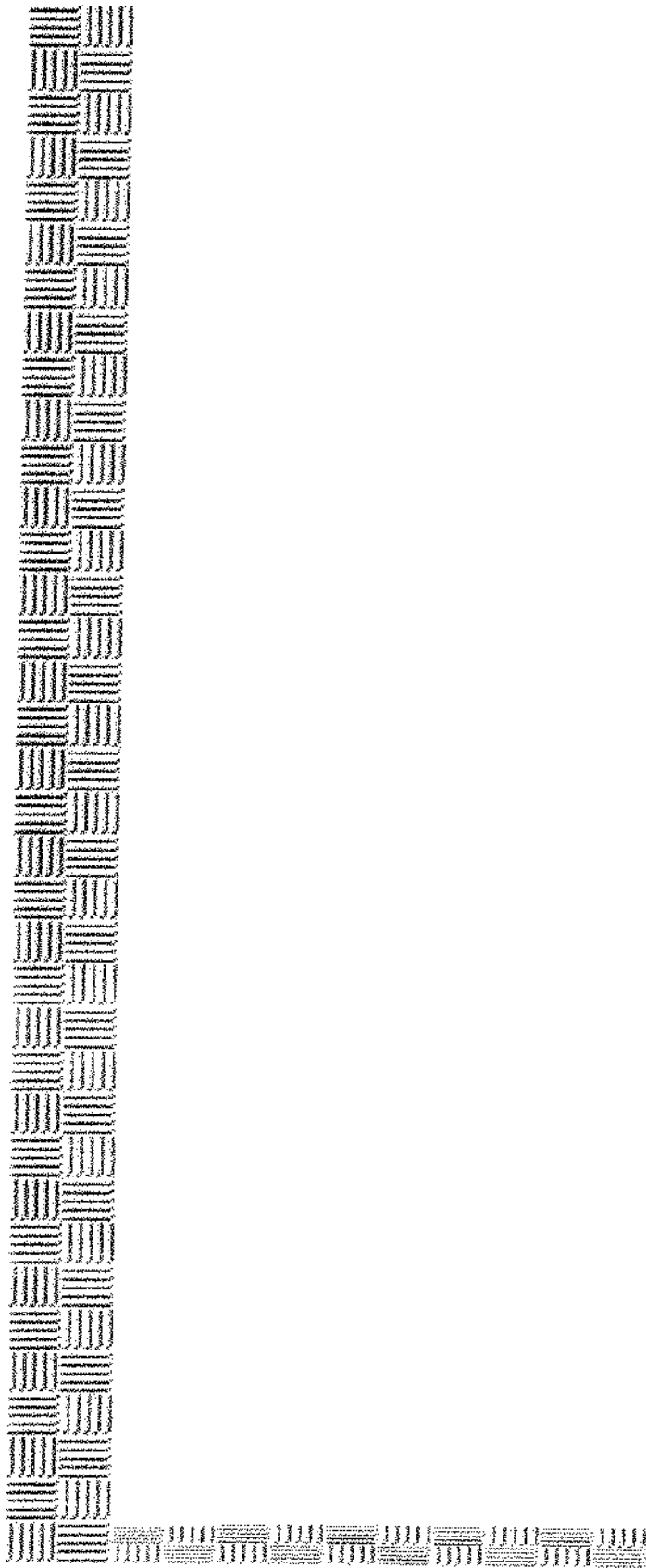
### 3.2.5.6. Hibridização

Posteriormente à pré-hibridização, as sondas previamente marcadas foram adicionadas a recipientes plásticos com os filtros, após desnaturação por 2 minutos a 95°C, e incubadas por 6 horas à temperatura com dois graus abaixo da seguinte fórmula:  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  °C ( $T_m$  = temperatura de "melting").

Posteriormente foram realizadas duas lavagens à temperatura ambiente, por 5 e 15 minutos, respectivamente, em solução contendo 2X SSPE, 0,1% SDS. A seguir, foi realizada a última lavagem à temperatura com dois graus acima do calculado para  $T_m$  (Temperatura de lavagem =  $T_m + 2$ ), por 10 minutos, com solução contendo 5X SSPE, 0,15% SDS. Após a hibridização, os filtros foram secos e expostos em filme de raios X, durante 12 horas, a -70°C, com utilização de intensificadores de imagens para autoradiografia.

### 3.3. MÉTODO ESTATÍSTICO

As frequências antigênicas observadas em pacientes e controles foram comparadas através do teste de  $\chi^2$  com correção de Yates. Utilizaram-se ainda, os testes de Fisher e Mann-Whitney. A população controle dos pacientes caucasóides foi uma amostra da população caucasóide da região de Campinas, analisada essencialmente com a mesma bateria de anti-soros utilizada no presente estudo, no Laboratório de Histocompatibilidade do Hemocentro do HC-UNICAMP.



## ***4. Resultados***

#### 4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Dos 65 pacientes avaliados, 55 (84,6%) eram do sexo feminino e 10 (15,4%) do masculino. A idade variou de 26 a 70 anos, com média de 53 e desvio padrão de 11 anos. O tempo de doença variou de três a 38 anos, com média de 13 e desvio padrão de oito anos. As manifestações extra-articulares estavam presentes em 22 pacientes (33,8%). Os títulos do FR variaram de 1/40 a 1/2560. Apenas 22 pacientes não apresentaram erosões ósseas ao exame radiográfico (Tabela 1). O número de critérios da ARA variou de cinco a sete, sendo que a maioria dos pacientes (55,2%) apresentou seis critérios. A classificação funcional de Steinbrocker variou de um a quatro, com 45 pacientes (69,2%) na classificação 2.

O envolvimento extra-articular mais freqüente foi o nódulo subcutâneo que ocorreu em 15 pacientes (23,1%). Dois pacientes manifestaram uveíte, outros dois Síndrome de Sjögren e mais dois Síndrome do túnel do carpo. Um paciente teve amiloidose renal, outro neuropatia periférica e vasculite cutânea foi observada em um caso (Tabela 2).

A comparação clínica foi feita em todos os pacientes, avaliados quanto ao sexo, tempo de doença, idade, idade de início, FR, manifestações extra-articulares, nódulo subcutâneo, erosão óssea e tipo de tratamento, não sendo evidenciada qualquer associação além das já esperadas.

**TABELA 1 : AR: Caracterização epidemiológica e clínico-laboratorial em 65 pacientes.**

Sexo	masculino	15,4%
	feminino	84,6%
Idade *		53
Idade de início*		40
Tempo de doença*		13
Manifestação Extra-articular	ausente	66,2%
	presente	33,8%
F R	< 1:160	29,5%
	≥ 1:160 e ≤ 1:320	47%
	≥ 640	23,5%
Erosão óssea	presente	66,2%
	ausente	33,8%

\* = média de idade em anos

**TABELA 2: AR: Manifestações extra-articulares em 65 pacientes**

Manifestações Extra-Articulares	Total de Pacientes
Nódulo reumatóide	23,1
Uveíte	3
Síndrome de Sjogren	3
Síndrome do Túnel do Carpo	3
Amiloidose Renal	1,5
Neuropatia Periférica	1,5
Vasculite Cutânea	1,5

---

Valores em porcentagem

## 4.2. DISTRIBUIÇÃO DOS ANTÍGENOS HLA-A E HLA-B

Não houve aumento da frequência dos antígenos HLA-A e HLA-B nos pacientes com AR, quando comparados com o grupo controle (Tabela 3 e 4).

**TABELA 3:** AR: Frequência fenotípica de antígenos HLA-A em 65 pacientes. Comparação com frequências observadas em população controle.

Antígenos HLA	Pacientes n = 65	Controles n = 165	p
A1	15,3	18,1	NS
A2	53,8	44,8	NS
A3	20,0	18,7	NS
A9	24,6	27,2	NS
A10	12,3	8,4	NS
A11	9,2	13,9	NS
A28	6,1	2,4	NS
A29	9,2	11,5	NS
A30	4,6	3,0	NS
A31	3,0	4,2	NS
A32	4,6	3,0	NS
A33	7,6	2,4	NS

Valores em porcentagem

NS = não significativo

**TABELA 4: AR: Frequência fenotípica de antígenos HLA-B observada em 65 pacientes. Comparação com frequências observadas em população controle.**

Antígenos HLA	Pacientes (n = 65)	Controles (n = 165)	p
B5	30,7	18,1	NS
B7	13,8	12,1	NS
B8	6,1	9,0	NS
B12	27,6	19,3	NS
B13	3,0	1,8	NS
B14	12,3	6,0	NS
B15	10,7	6,6	NS
B16	1,5	1,2	NS
B17	4,6	3,6	NS
B18	7,6	7,8	NS
B21	6,1	11,5	NS
B22	4,6	1,2	NS
B27	3,0	6,0	NS
B35	16,9	23,6	NS
B39	1,5	1,8	NS
B40	12,0	6,0	NS
B41	1,5	1,2	NS
B53	1,5	1,5	NS

Valores em porcentagem

NS = não significativo



### 4.3. DISTRIBUIÇÃO DOS ANTÍGENOS HLA-DR E DQ

O antígeno HLA mais frequentemente encontrado nesses pacientes foi o HLA-DR1, com 26,2% de positividade. Este resultado mostrou-se significativo, uma vez que no grupo controle ele estava presente em apenas 11,1% ( $p < 0,05$ ). O HLA-DR4 apresentou-se em 24,6% dos pacientes com AR e em 18% dos controles, não sendo, porém, um aumento significativo (Tabela 5). Verificou-se, em dois pacientes, positividade para HLA-DR4 e HLA-DR1.

A frequência dos HLA-DQ1, DQ2 e DQ3 também não mostrou diferença significativa, em relação à frequência observada no grupo controle (Tabela 6). A associação de DQ3 e DR4 esteve presente em 14 pacientes.

**TABELA 5:** AR: Frequência fenotípica de antígenos HLA-DRB1 em 65 pacientes. Comparação com frequências observadas em população controle.

Antígenos HLA	Pacientes (n=65)	Controles (n=206)	P <sub>Nc</sub>
DR1	26,2	11,1	0,005*
DR2	15,3	14,5	NS
DR3	9,2	11,6	NS
DR4	24,6	18,0	NS
DR7	32,3	22,3	NS
DR11	41,5	36,8	NS

Valores em porcentagem

NS = não significativo

P<sub>Nc</sub> = valor de P não corrigido

\* =  $p < 0,05$  após correção para o número de comparações realizadas.

**TABELA 6:** AR: Frequência fenotípica de antígenos HLA-DQ em 65 pacientes. Comparação com frequências observadas em população controle.

HLA	Pacientes n=65	Controles n=171	p
DQ1	44,6	41,5	NS
DQ2	30,7	24,5	NS
DQ3	50,7	47,3	NS

Valores em porcentagem

NS = não significativo

#### 4.4. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ANTÍGENOS HLA-DR E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Os pacientes com positividade para HLA-DR1 não mostraram associação a nenhuma das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas.

Aqueles com HLA-DR4 positivo, quando comparados aos com HLA-DR4 negativo, apresentaram maiores títulos de FR ( $p < 0,05$ ) (Tabela 7) e um pior grau na CFS ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8).

A presença de erosões ósseas ao exame radiográfico foi mais freqüente naqueles com HLA-DR4 positivo (93,8%) do que nos pacientes com HLA-DR4 negativo (57,1%) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 9). Os dois que apresentaram positividade para DR1 e DR4 tinham manifestações extra-articulares, erosão óssea, FR em altos títulos (1/640), grau 3 na CFS e receberam tratamento agressivo.

**TABELA 7: AR: Títulos de Fator Reumatóide e HLA DR4 e DR1 em 65 pacientes**

FR	Total de pacientes	DR4		DR1	
		+	-	+	-
1:40	1,5	0	2	0	2
1:80	28	13	33	29	27
1:160	32	31	33	35	31
1:320	15	13	16	24	13
1:640	17	31*	12	12	19
>640	6,5	12*	4	0	8

Valores em porcentagem

\* = p <0,05

**TABELA 8: AR: Classificação funcional de Steinbrocker (CFS) em 65 pacientes.**

CFS	Total de pacientes	DR4		DR1	
		+	-	+	-
I	5	0	6	0	6
II	69	56	74	76	67
III	18	31*	14	24	17
IV	8	13 *	6	0	10

Valores em porcentagem

\* = p <0,05

**TABELA 9:** AR: Erosões ósseas e HLA-DR4 e DR1 em 65 pacientes.

Erosão óssea	Total de pacientes	DR4 +	DR4 -	DR1 +	DR1 -
presente	83	93,8*	57,1	76,5	62,5
ausente	17	6,2	42,9	23,5	37,5

Valores em porcentagem

\* =  $p < 0,05$

#### 4.5. DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS HLA-DRB1

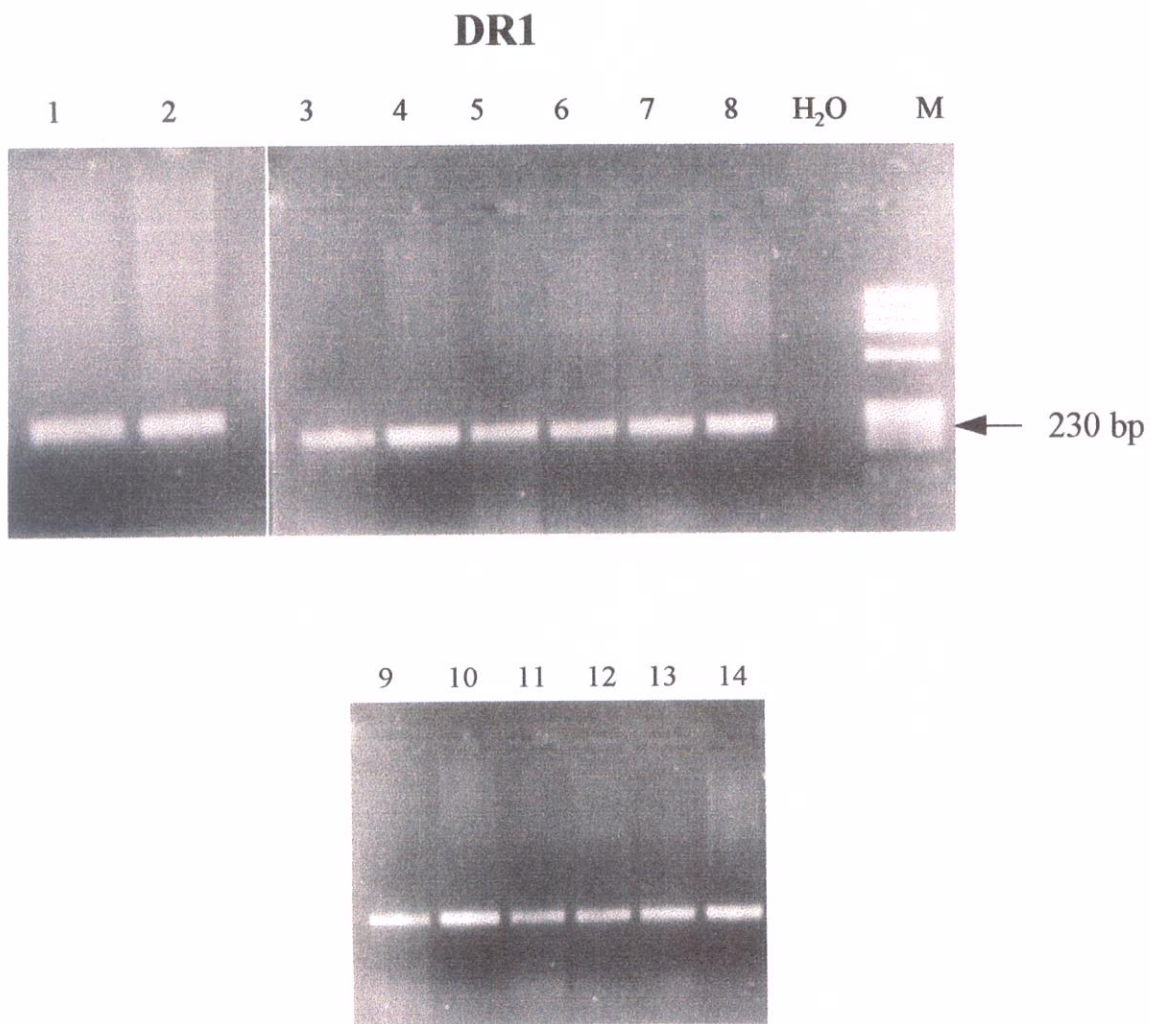
Dos 17 pacientes com AR e HLA-DR1 positivo, 14 tiveram o DNA amplificado pela "PCR", os outros três não continuaram o estudo (figura 4). Com a amplificação do DNA, foram avaliados quanto aos alelos HLA-DRB1\*01. A figura 5, representa os locais em que foram aplicadas as 14 amostras dos DNA amplificados e um controle negativo. Todos os 14 pacientes apresentaram marcação positiva para a sonda que identificava aqueles com alelos HLA-DRB1\*0101 e (ou) \*0102 (figura 6). Cinco amostras foram positivas, para a sonda que identificava apenas os alelos HLA-DRB1\*0102 (figura 7). Nenhuma mostrou positividade para a que identificava apenas o alelo HLA-DRB1\*0103, enquanto que dez foram positivas para a sonda que identificava os alelos HLA-DRB1\*0101 e (ou) \*0103 (figura 8).

Desse modo, o alelo HLA-DRB1\*0101 estava presente em 10 (71,4%) e o alelo HLADRB1\*0102 em cinco pacientes (35,7%). Apenas um apresentou alelos HLADRB1\*0101-\*0102. Nenhum deles mostrou aumento significativo quando comparados com a população controle (Tabela 10).

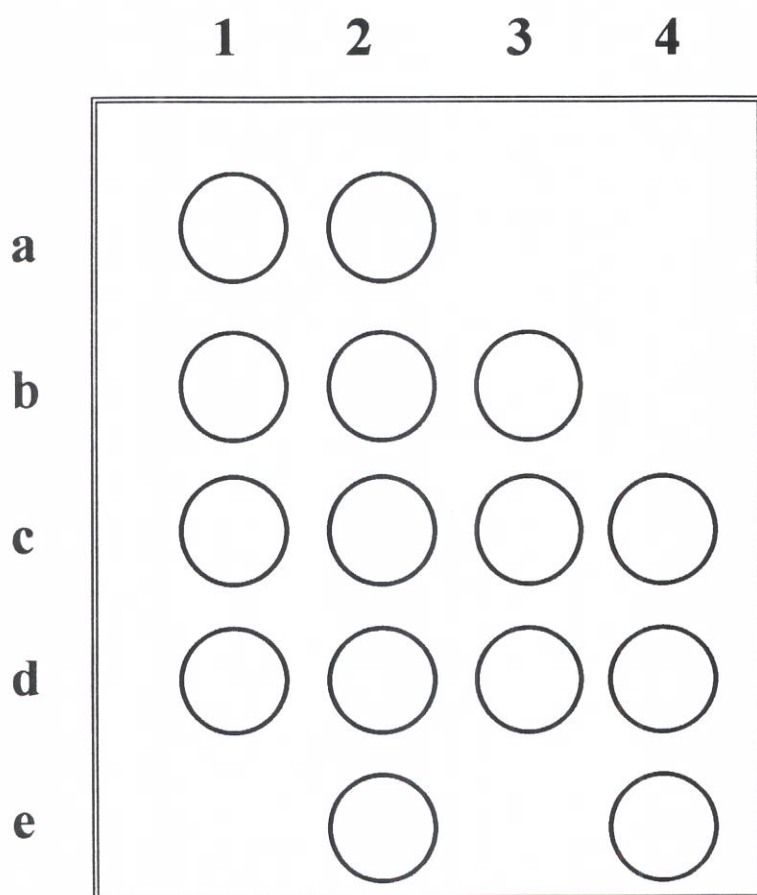
**FIGURA 4: Eletroforese em gel de agarose a 2% da amplificação do DNA de 14 pacientes positivos para DR1.**

**Posição M :  $\Phi$ x 174 Hae III**

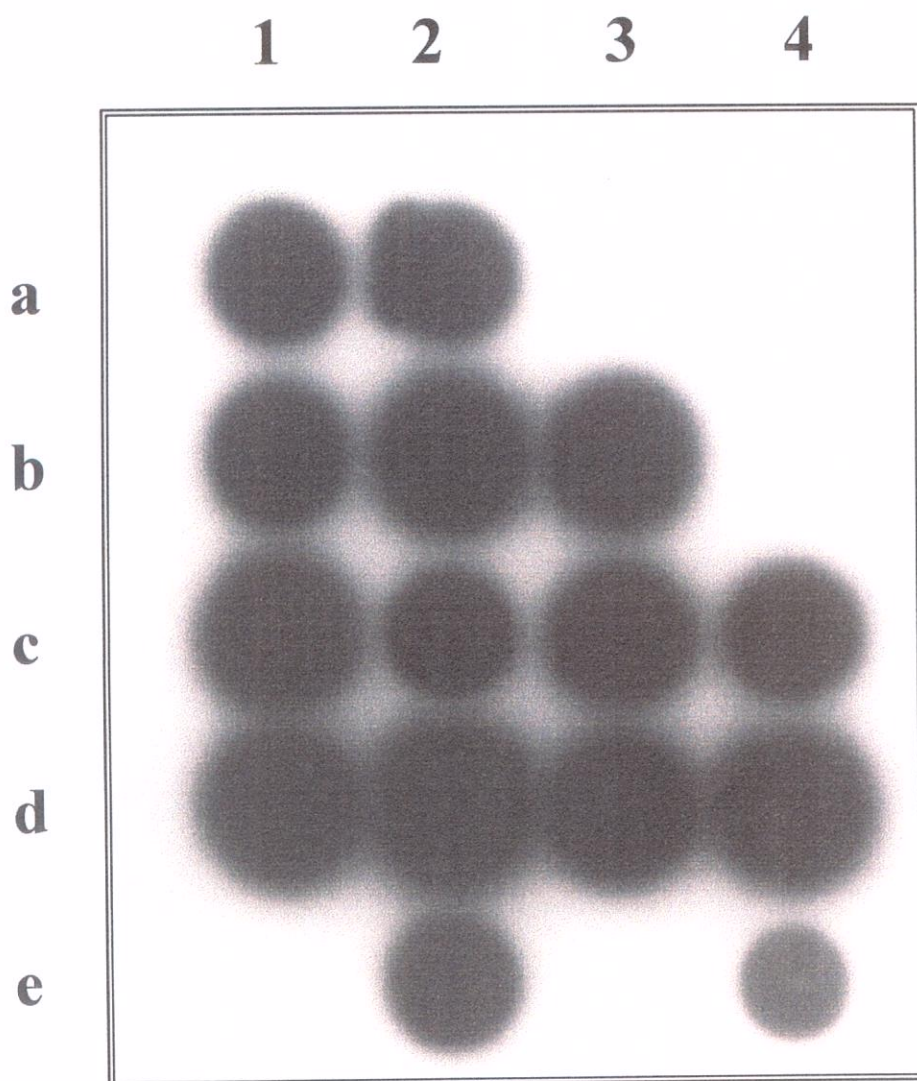
**Posição 1 a 14 : DNA amplificado de 14 pacientes com DR1 positivo**



**FIGURA 5 - Esquema que representa os locais de aplicação das amostras de DNA amplificado dos pacientes com HLA DR1 positivos. Posição 4e = controle negativo.**

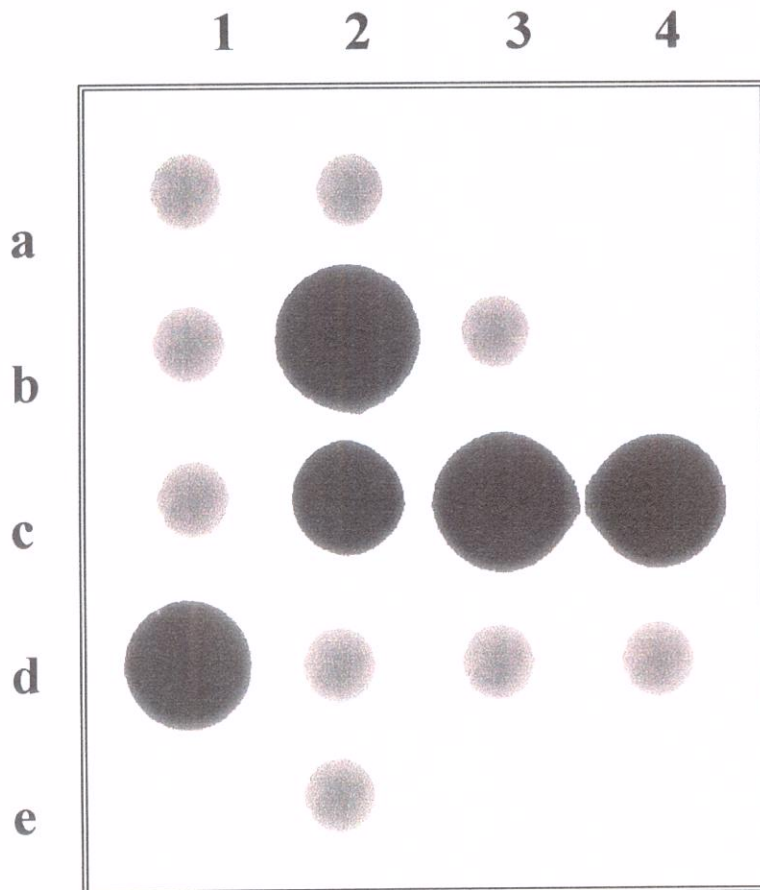


**FIGURA 6:** *Hibridização alelo específica para HLA DRB1 0101 e \* 0102. Todos os 14 pacientes apresentaram marcação positiva, com exceção da amostra 4 e (controle negativo).*



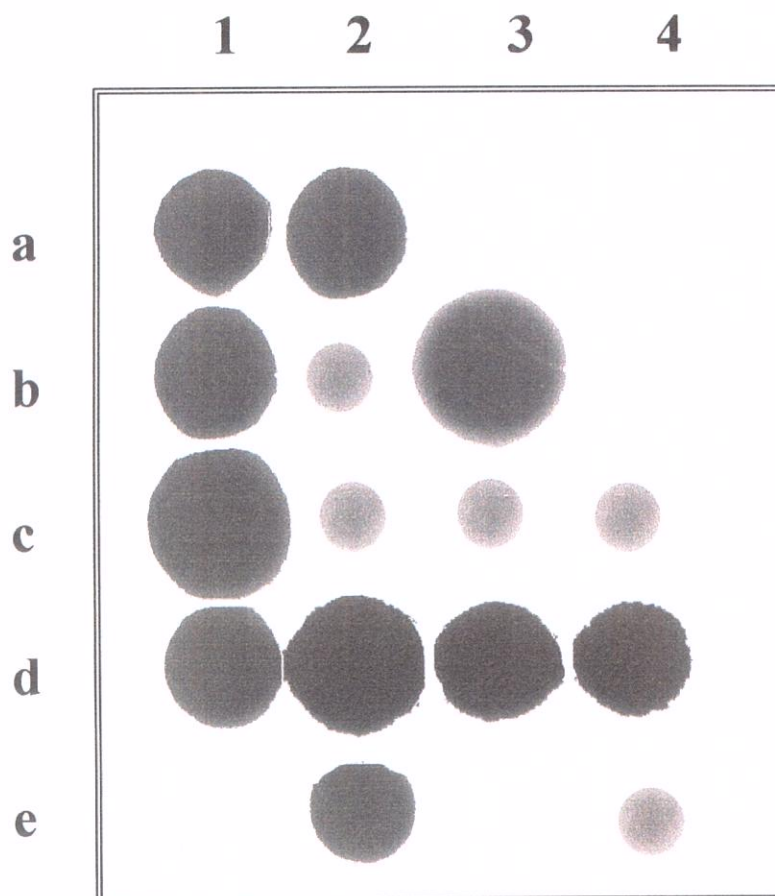
**FIGURA 7: Hibridização alelo específica para HLA DRB1 \* 0102. Os pacientes das posições 1d, 2b, 2c, 3c e 4c apresentaram marcação positiva.**

obs: O paciente da posição 1d também apresentou marcação positiva para o HLA DRB1 \*0101, logo ele é positivo para o HLA DRB1 \*0101 e \*0102.





**FIGURA 8:** Hibridização alelo específica para HLA DRB1 \*0101 e \* 0103. Os pacientes das posições 1a, 1b, 1c, 1d, 2a, 2d, 2e, 3b, 3d e 4d apresentaram marcação positiva. Como todos os pacientes foram positivos para o HLA DRB1 \*0101 e \*0102 e nenhum para o HLA DRB1 \*0103, os 10 pacientes positivos nesta fig. são HLA DRB1 \*0101.



**TABELA 10:** AR: Freqüência dos alelos HLA-DRB1\*01 (HLA-DRB1\*0101; 0102 e 0103) em pacientes e controles

Alelos	Pacientes n=14	Controles n=18	p
0101	10(71,4)	13(72,2)	NS
0102	5(35,7)	4(22,2)	NS
0103	0	1(5,6)	

( ) = porcentagem

NS=não significativo

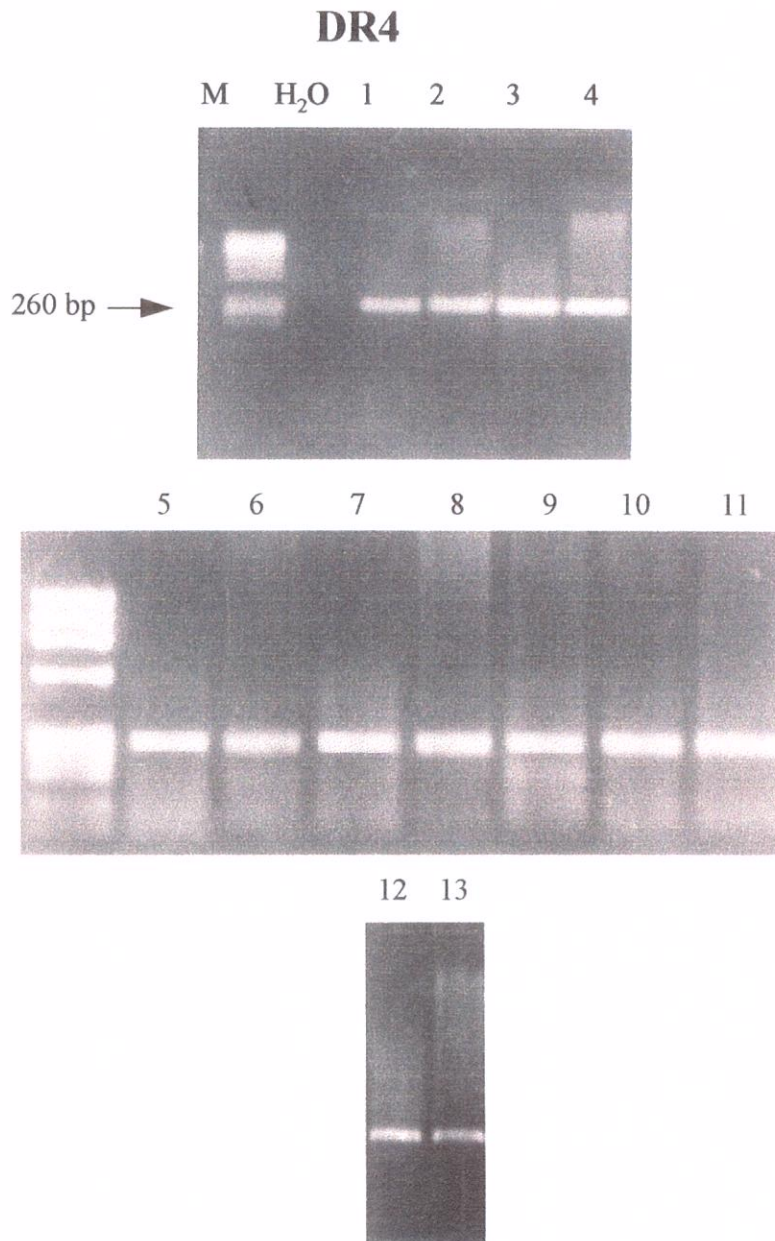
OBS: um dos pacientes apresentou alelos 0101-0102

Dos 16 com AR e HLA-DR4 positivo, 13 tiveram o DNA amplificado pela “PCR”, três pacientes não seguiram o estudo (figura 9). Após a amplificação foram avaliados quanto aos alelos HLA-DRB1\*04. A figura 10, representa os locais em que foram aplicadas as amostras dos DNA amplificados e um controle negativo. O alelo HLADRB1\*0401 estava presente em três (23,1%) (figura 11) e o alelo HLADRB1\*0404 em nove pacientes (69,2%) (figura 12). O alelo HLADRB1\*0405 não estava presente nos pacientes avaliados. Neste grupo, um deles, não apresentou positividade para os alelos HLA-DRB1\*04 analisados, podendo ser, portanto, positivo para algum outro subtipo do HLA-DR4. Apenas um apresentou alelos HLADRB1\*0101-\*0404. Não houve predomínio de um dos alelos, quando comparados com a população controle (Tabela 11).

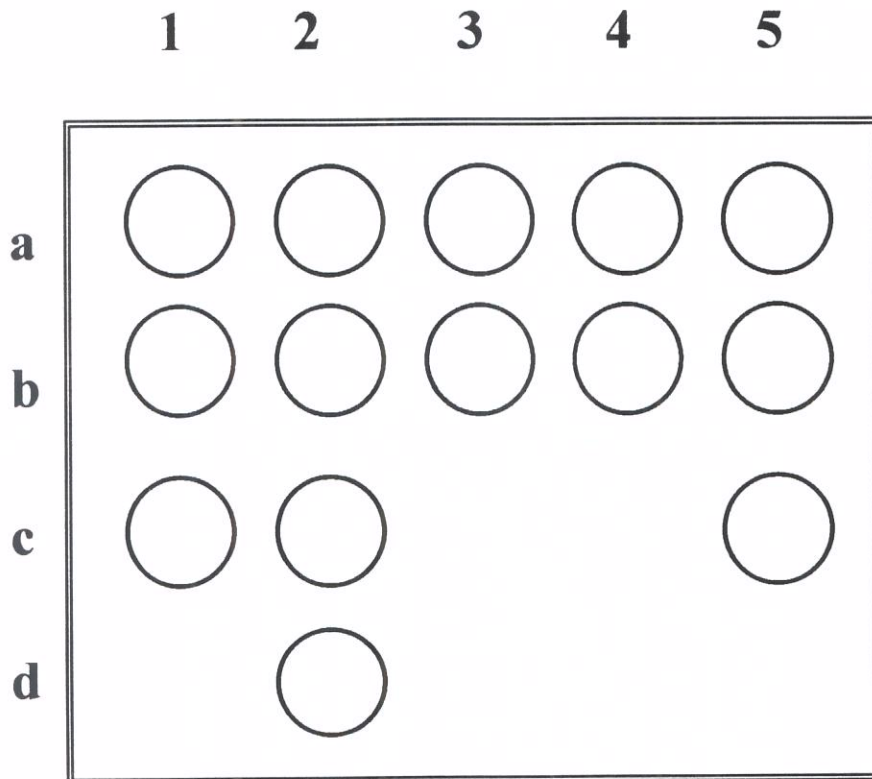
**FIGURA 9: Eletroforese em gel de agarose a 2% da amplificação do DNA de 13 pacientes com HLA - DR4 positivos.**

**M :  $\phi$ x 174 Hae III**

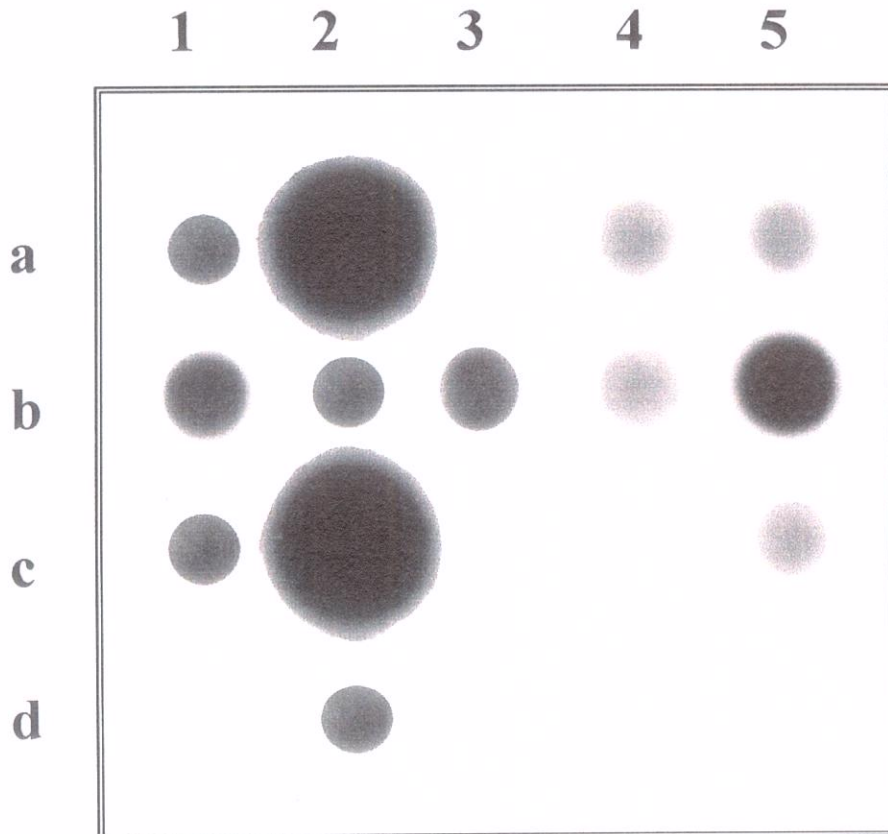
**Posição 1 a 15 : DNA amplificado de 14 pacientes com DR4 positivo**



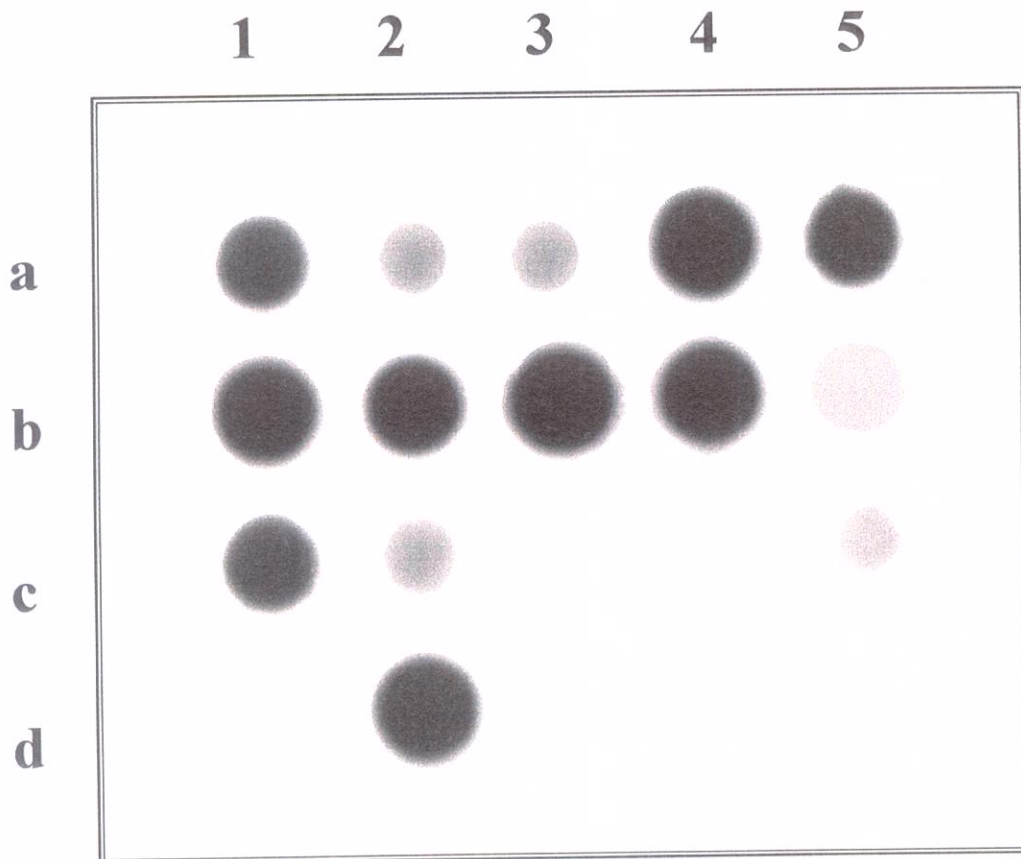
**FIGURA 10:** Esquema que representa os locais de aplicação das amostras de DNA amplificado dos 13 pacientes HLA DR4 positivos  
Posição 5C é o controle negativo.



*FIGURA 11 - Hibridização alelo específica para HLA DRB1 \*0401. Os pacientes das posições 2a, 2c e 5b foram positivos para o HLA DRB1 \*0401.*



**FIGURA 12 -** Hibridização alelo específica para HLA DRB1 \*0404. Os pacientes das posições 1a, 1b, 1c, 2b, 2d, 3b, 4a, 4b, 5a foram positivos para o alelo HLA DRB1 \*0404.





**TABELA 11:** AR: Frequência dos alelos HLA-DRB1\*04 (HLA-DRB1\*0401; 0404 e 0405) em pacientes e controles

Alelos	Pacientes n=13	Controles n=12	p
0401	3(23,1)	3(25)	NS
0404	9(69,2)	11(91,7)	NS
0405	0	0	
outros	1(7,7)	1(8,3)	NS

( ) = porcentagem

OBS: três controles apresentaram alelos 0401-0404

#### 4.6. ASSOCIAÇÃO DOS ALELOS HLA-DRB1 E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

Quanto às variáveis epidemiológicas e clínicas, não se observou associação significativa entre a presença ou ausência dos alelos HLA-DRB1\*0101 e \*0102, o mesmo ocorrendo em relação aos HLA-DRB1\*0401 e \*0404.

Não houve associação entre o FR e a presença ou ausência do alelo HLA-DRB1\*0101. A frequência da erosão óssea estava aumentada em pacientes com HLA-DRB1\*0101, quando comparada com HLADRB1\*0102, porém, não significativamente ( $0,10 < p < 0,20$ ) (Tabela 12).

Quando se analisou a presença do FR e dos alelos HLA-DRB1\*0401 e \*0404, observou-se que pacientes com HLA-DRB1\*0404 apresentaram os maiores títulos de FR (acima de 1/320) ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 1). Não houve associação à erosão óssea e à presença ou ausência de HLA-DRB1\*0401 ou \*0404 (Tabela 13), quando da comparação entre estes dois alelos.

Os pacientes com alelos HLA-DRB\*0404 apresentaram os maiores títulos de FR, quando comparados com todos os pacientes estudados ( $p < 0,05$ ) (gráfico 2). A erosão óssea estava presente em oito dos nove doentes com HLA-DRB\*0404, mostrando uma tendência a esta associação, quando comparados com todos os pacientes negativos, para o HLA-DRB1\*0404 ( $p > 0,05$ ) ( Tabela 14), o mesmo ocorrendo em relação aos piores graus da CFS ( $p > 0,05$ )(Gráfico 3).

Os três que foram positivos para o HLA-DRB1\*0401 apresentaram erosão óssea, dois estavam nos graus 3 e 4 da CFS e um, no grau 2, sendo que os três possuíam  $FR < 1:320$ .

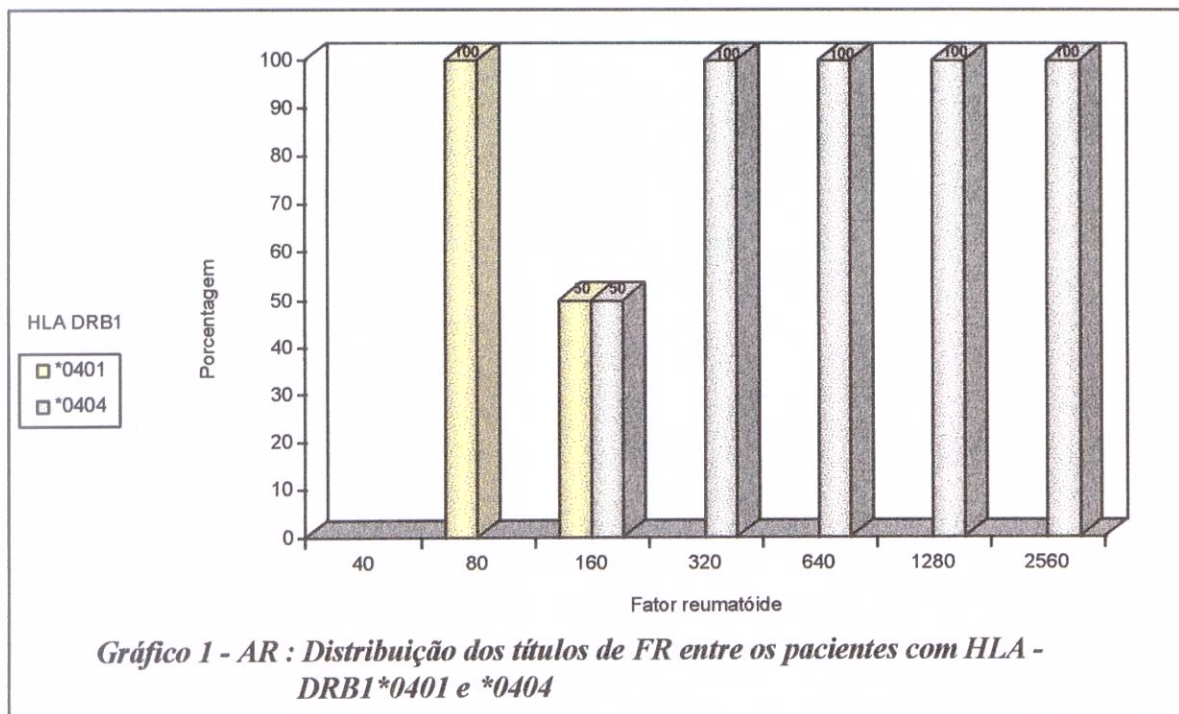
Agrupando-se os pacientes com HLA-DRB1\*0101, \*0401 e \*0404, que possuem seqüências de oligonucleotídeos semelhantes na região 70-74 (QKRAA / QRRAA), observou-se maior freqüência de erosões ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 4). Em relação à CFS e aos títulos de FR, não houve associação significativa ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 12:** AR: Alelos HLA-DRB1\*01 e erosão óssea.

Erosão óssea	0101	0101	0102	0102
	+	-	+	-
presente	90	50	60	89
ausente	10	50	40	11

Valores em porcentagem

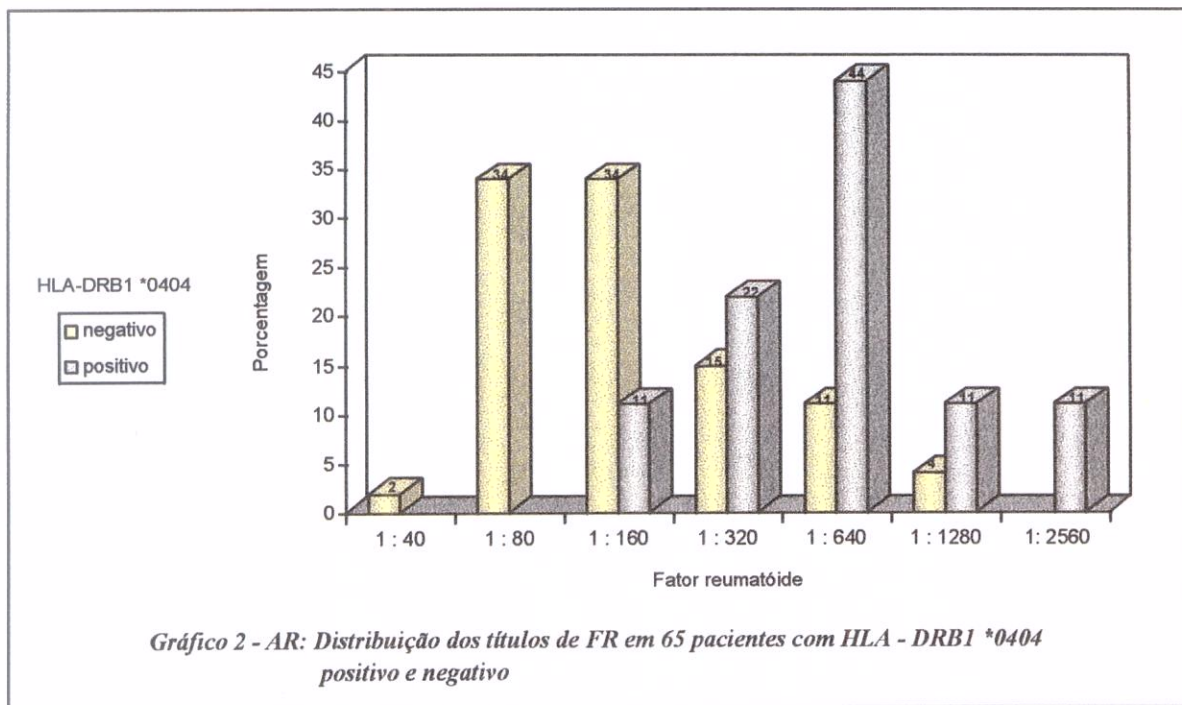




**TABELA 13: AR: Erosão óssea e alelos HLA-DRB1\*04**

Erosão óssea	0401 +	0401 -	0404 +	0404 -
presente	100	90	89	100
ausente	0	10	11	0

Valores em porcentagem

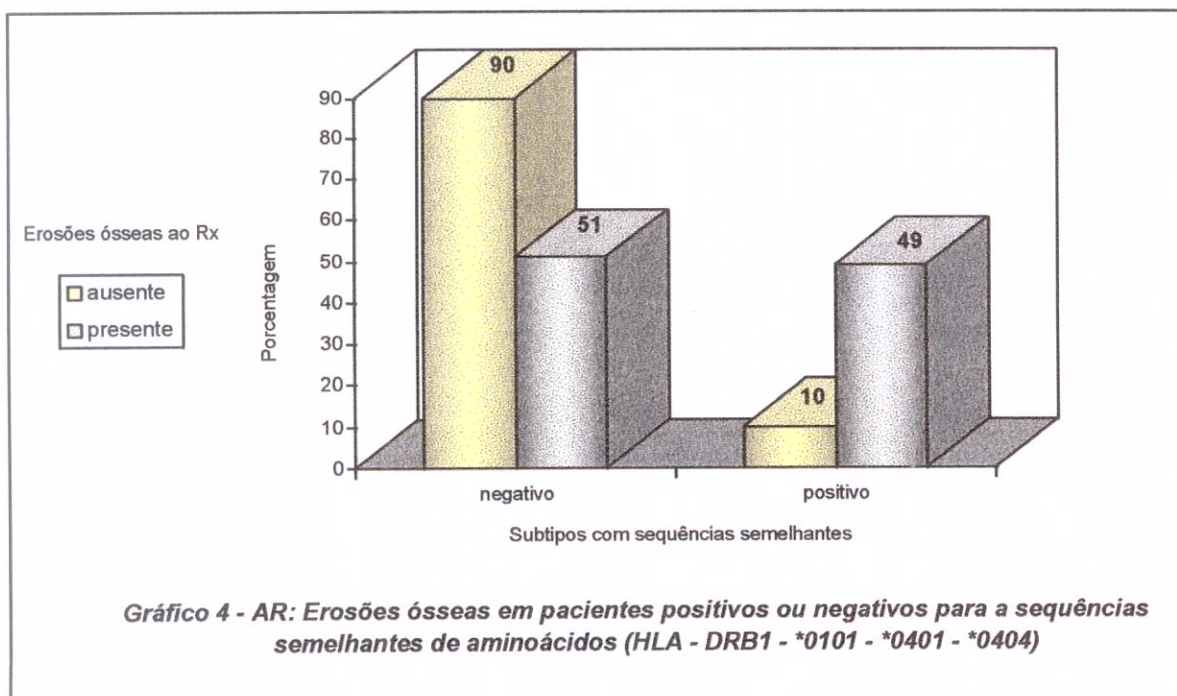
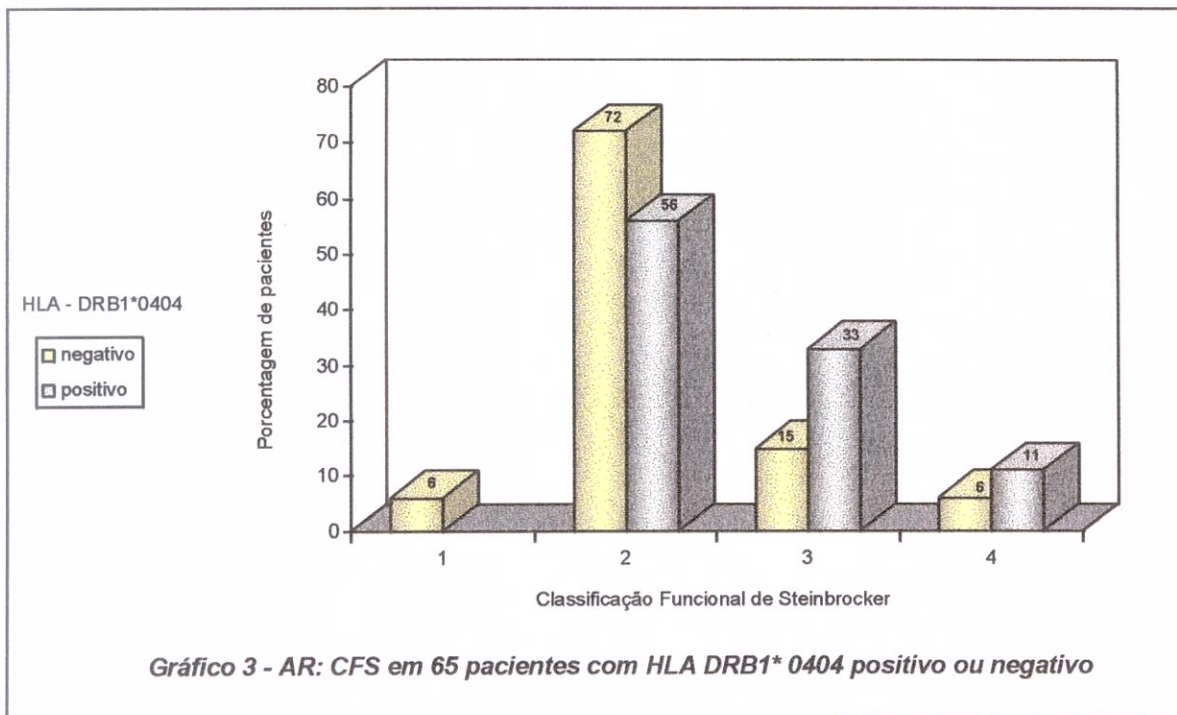


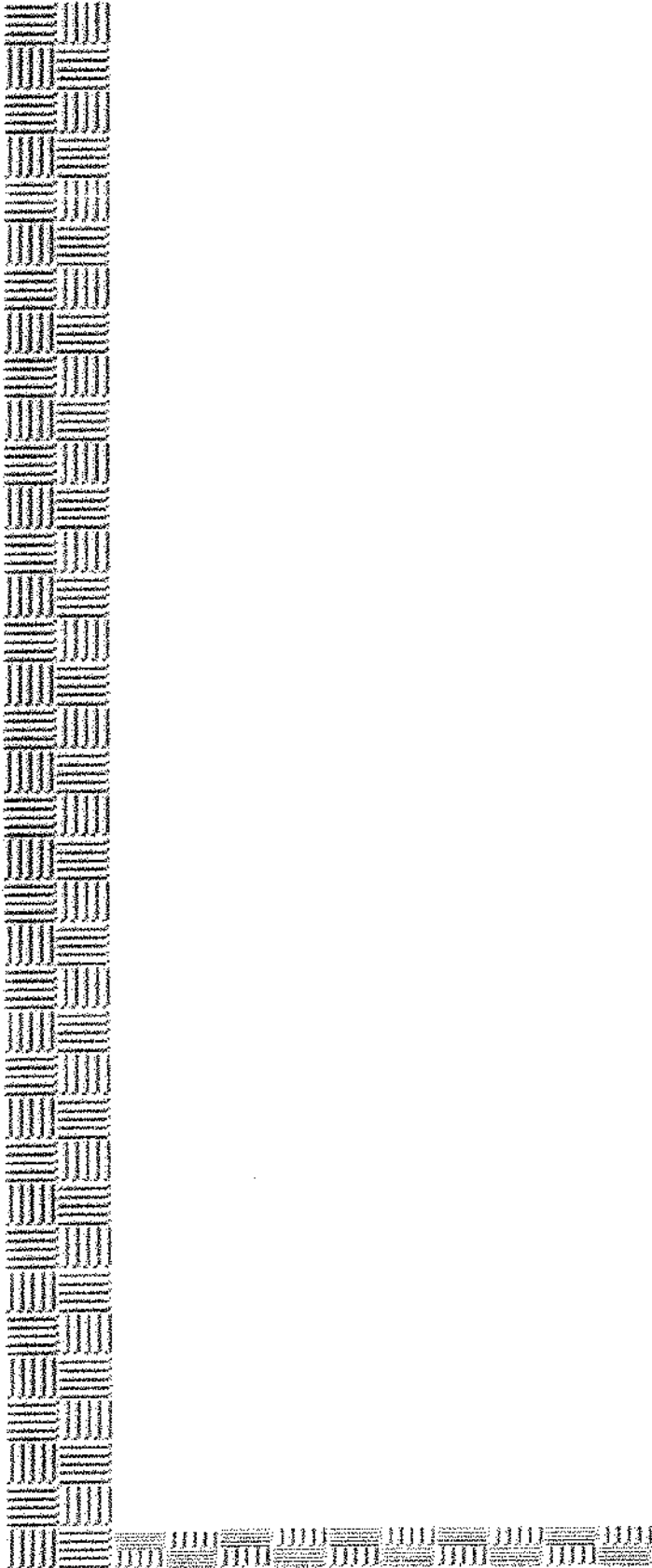
**TABELA 14:** AR: Erosão óssea e HLA-DRB1\*0404 em 65 pacientes

Erosão óssea	0404 +	0404 -
presente	8 (88,9)*	32 (60,4)
ausente	1 (11,1)	21 (39,6)

( ) = porcentagem

\* =  $p > 0,05$





## ***5. Discussão***

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 e o mais homogêneo possível do ponto de vista étnico, razão pela qual optou-se por avaliar pacientes caucasóides. A seleção dos pacientes deste estudo baseou-se nos critérios da ACR para AR, tomando-se o cuidado de somente incluir pacientes com positividade para o FR e com envolvimento poliarticular, para diminuir o risco de doentes com quadro de artrite inflamatória que poderiam evoluir para outras doenças, como as espondiloartropatias soronegativas, sarcoidose ou outras enfermidades do tecido conjuntivo. O fato desta casuística englobar doentes com longo tempo de evolução (média de 13 anos), portanto com acompanhamento clínico longitudinal, colaborou para que esta seleção fosse mais precisa. Esta seleção rigorosa foi fundamentada por observações anteriores que encontraram diferentes antígenos de histocompatibilidade em pacientes com AR e outras artrites inflamatórias. Assim, GOUGH et al. (1994) estudando pacientes com artrite inflamatória, observaram, nestes, resultados de genotipagem diferentes daqueles com AR comprovada. KAARELA et al. (1990) encontraram, em pacientes classificados primariamente como tendo AR soronegativa, outras artrites inflamatórias durante a evolução. O estudo de associação com antígenos HLA classe I, mostrou aumento significativo da frequência de HLA-B27.

As características clínicas e epidemiológicas dos pacientes estudados não diferiram de outros estudos em população caucasóide (ALARCON, 1995). A idade de início da doença, ao redor dos 40 anos, e a predominância do sexo feminino foram semelhantes ao já observado na literatura, ainda que a frequência do sexo feminino tenha sido superior a algumas grandes séries, porém, similar ao verificado por MASSARDO et al. (1995). Da mesma forma, entre as manifestações extra-articulares presentes em 33,8% dos pacientes, o nódulo reumatóide foi o mais frequentemente observado (23,1%) e erosão óssea foi demonstrada em 66%.

Na análise estatística utilizamos a correção do valor de “p”, por se tratar de um primeiro estudo sobre a associação entre antígenos HLA e AR, 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 (SVEJGAARD & RYDER, 1979).

A associação da AR com os antígenos de histocompatibilidade HLA-DRB1 vem sendo demonstrada em inúmeros estudos, em diferentes populações (STASTNY et al., 1978; OHTA et al., 1982; JARAQUEMADA et al., 1986; SANCHEZ et al., 1990; YEN et al., 1995). A associação mais freqüentemente citada em população caucasóide é com o HLA-DR4, sugerindo, essa associação, um aumento da suscetibilidade à AR, porém, mais recentemente, sabe-se que há um papel importante nos fatores que determinam evolução para uma doença mais progressiva e agressiva (YOUNG et al., 1994; OLSEN et al., 1988; NELSON et al., 1994). Neste estudo, a freqüência do antígeno HLA-DR4 nos pacientes com AR foi de 24,6%, enquanto que, no grupo controle, foi de 18%. Contudo, este aumento da freqüência não foi significativo, à semelhança do que se encontrou em pacientes de Israel, Grécia, sul da França, Itália, Kuwait, Espanha e Chile, onde uma fraca ou insignificante associação com DR4 e pacientes com AR foi encontrada, demonstrando que esta associação não é universal (SCHIFF et al., 1982; SATTAR et al., 1990; SANCHEZ et al., 1990; SALVARANI et al., 1992; BOKI et al., 1993; BENAZET et al., 1995; MASSARDO et al., 1990).

HLA-DR1 foi o antígeno de histocompatibilidade mais freqüente nos pacientes com AR (26,2%), representando um aumento significativo em relação à população controle. O aumento da freqüência de HLA-DR1 também foi observado em outros estudos em população caucasóide (BARDIN et al., 1985; NEPON et al., 1989), e em asiáticos (NICHOL & WOODROW, 1981). Como tanto o HLA-DR4 e o HLA-DR1 pertencem ao locus HLA-DRB1 e apresentam associação à AR, pode-se cogitar que algum fator dentro desta região está relacionado ao desencadeamento da doença reumatóide.

Apesar do aumento da frequência de HLA-DR1, não foi observada associação significativa a nenhuma das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas. Apenas dois pacientes apresentaram nódulo subcutâneo, outros dois Síndrome de Sjogren e um, neuropatia periférica. Os pacientes com HLA-DR1 positivo não mostraram diferença significativa quanto aos títulos de fator reumatóide, quando comparados com HLA-DR1 negativo, o que não foi observado por BARDIN et al. (1985), que encontraram associação de AR ao HLA-DR1 apenas nos casos com FR negativo. No entanto, OLSEN et al. (1988), não constatarem diferença significativa entre os pacientes com HLA-DR1 positivo e HLA-DR1 negativo em relação ao FR, alterações radiográficas e estado funcional. Um outro trabalho demonstrou associação do HLA-DR1 à AR, nos pacientes com FR positivo (SCHIFF et al., 1982).

As manifestações extra-articulares também não apresentaram associação significativa ao HLA-DR4. O nódulo subcutâneo ocorreu em cinco pacientes, Síndrome de Sjögren, amiloidose renal, uveíte e Síndrome do túnel do carpo em um paciente cada. A ausência de relação entre HLA-DR4 e as manifestações extra-articulares também foi observada por ALARCON et al., (1982), que encontraram associação de nódulos subcutâneos e vasculite apenas em pacientes soropositivos e nenhuma relação com DR4. Entretanto, WERSTEDT et al. (1986); SALVARANI et al. (1992); observaram associação de DR4 a manifestações extra-articulares, principalmente com os nódulos subcutâneos.

Os pacientes com positividade para HLA-DR4, quando avaliados funcionalmente (CFS), apresentavam graus mais avançados quando comparados com os pacientes HLA-DR4 negativos, demonstrando que a presença de DR4 está significativamente relacionada com uma evolução de doença mais incapacitante ( $p < 0,05$ ). O FR em altos títulos também associou-se significativamente à presença de HLA-DR4 ( $p < 0,05$ ), mas não ao HLA-DR1, à semelhança do observado em alguns estudos, embora tenha sido demonstrado que a AR destrutiva está relacionada com HLA-DR4, tanto em pacientes FR positivo como negativo (OLSEN, 1988; CALIN et al., 1989). Apesar de controversa, a associação de maiores títulos de FR com HLA-DR4 é semelhante a um estudo que demonstrou que, indivíduos normais, com HLA-DR4 positivo, produzem altos



níveis de FR quando estimulados *in vitro*, mais do que pessoas que são HLA-DR4 negativo (OLSEN, STASTNY, JASIN, 1987). Os pacientes com HLA-DR4 positivo também apresentaram, mais freqüentemente, erosões ósseas (93,8%) ( $p < 0,05$ ), de acordo com o observado por OLSEN et al. (1988). Com relação à distribuição por sexo, verificou-se que todos os 16 pacientes que apresentavam positividade para o HLA-DR4 eram do sexo feminino, enquanto dos 49 negativos para o HLA-DR4, 39 eram do sexo feminino e 10, do masculino. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em outro trabalho em que o HLA-DR4 estava fortemente associado à AR no sexo feminino e com FR positivo (NELSON et al., 1994). OLSEN et al. (1988), porém observaram relação entre HLA-DR4 e positividade para o FR, mais no sexo masculino do que no feminino, mas essa diferença não era significativa. Estes resultados também não apontam uma diferença significativa entre os sexos, não se podendo, portanto, afirmar que pacientes do sexo feminino, apresentem doença mais agressiva que os do sexo masculino.

Apesar de não se verificar um aumento significativo na freqüência de HLA-DR4, as associações observadas com maiores títulos de FR, presença de erosões e pior estado funcional permitem que se conclua que os pacientes com positividade para HLA-DR4 podem apresentar uma doença mais agressiva do que os aqueles com HLA-DR4 negativo, o que vem de encontro ao anteriormente observado (CALIN et al., 1988). Estes resultados sugerem que, o HLA-DR4 define um subtipo de AR que é caracterizado pela presença de altos títulos de FR e mais alterações erosivas e, os pacientes com HLA-DR1, um outro subtipo, com menos alterações erosivas. Tais afirmações estão em concordância com as de ALARCON et al. (1982) e OLSEN et al. (1987), que concluíram que os antígenos HLA-DR1 e HLA-DR4 podem identificar subtipos diferentes de pacientes com AR.

A distribuição do HLA-DQ 1, 2 e 3 mostrou-se semelhante, em pacientes e no grupo controle. A associação do HLA-DQ3 ao HLA-DR4 esteve presente em quatorze dos dezessete pacientes positivos para HLA-DR4. Este resultado, também foi obtido por GAO et al. (1990b), que, contudo, observaram que os pacientes que apresentavam HLA-DR4



positivo associaram-se mais freqüentemente ao HLA-DQ7, que é um dos subtipos do HLA-DQ3.

A importância da análise da seqüência do locus DRB1 baseia-se nos diversos estudos que verificaram que a AR se relaciona com a positividade de HLA-DR4 e HLA-DR1, e ambos são produtos desse locus (KLARESKOG et al., 1982). Através de técnicas de genotipagem, podem-se identificar os alelos do locus DRB1 e suas seqüências de aminoácidos e, a partir desses achados, determinar quais alelos estão mais freqüentemente associados à AR (GREGERSEN, 1992).

Quando os subtipos do HLA-DR1 e DR4 são pesquisados, os genes do DNA genômico sofrem amplificação, usando-se “primers”. Posteriormente são hibridizados com a seqüência dos alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04. Realizando essa amplificação específica, evita-se a possibilidade de hibridização cruzada das sondas com outros genes que apresentam seqüências semelhantes aos dos alelos do HLA-DR1 e HLA-DR4. Como exemplo, sabe-se que a seqüência que caracteriza o HLA-Dw14 é idêntica à do HLA-DR1 (GAO et al., 1990c; LANCHBURY et al., 1990). Usando-se os “primers” específicos de DR1 e DR4, apenas os seus genes serão amplificados e, os subtipos de cada um, identificados individualmente, utilizando-se sondas específicas de oligonucleotídeos com seqüências marcadas para cada subtipo.

Os subtipos do HLA-DR1 mais freqüentes nestes pacientes foram os HLA-DRB1\*0101 e \*0102, freqüência já anteriormente observada (GAO et al., 1990b), contudo, sem um aumento significativo em relação à população controle. Apesar da alta freqüência do alelo HLA-DRB1\*0101 (71,4%), não houve um aumento significativo em relação à do alelo HLA-DRB1\*0102 (35,7%), quando comparada com a população controle.

Os alelos HLA-DRB1\*0401 e \*0404 foram os subtipos mais observados do HLA-DR4, com predominância do \*0404, porém, não significativamente em relação ao grupo controle.

O aumento da frequência de erosão óssea nos pacientes com a presença de HLA-DRB1\*0101, contudo, de forma não significativa ( $0,10 < p < 0,20$ ), demonstra uma tendência que poderia ser confirmada por estudos com número maior de doentes, ainda que a literatura não tenha revelado anteriormente esta associação. Os alelos HLA-DRB1\*0101 e HLA-DRB1\*0102 ou sua associação não se relacionaram significativamente com outras variáveis clínicas e laboratoriais. Os trabalhos realizados anteriormente não demonstraram associação importante destes alelos a variáveis da doença reumatóide que possa indicar gravidade, e sim com a suscetibilidade à doença, principalmente o HLA-DRB1\*0101 (GAO et al., 1990b).

Com relação aos subtipos do HLA-DR4, nenhuma associação clínica e (ou) laboratorial pode ser estabelecida, quando se analisou apenas os pacientes com positividade para o HLA-DR4, com exceção do HLA-DRB1\*0404 e maiores títulos do FR. PLOSKI et al. (1994) demonstraram que, pacientes com AR com altos títulos de FR apresentavam uma forte associação ao DRB1\*0401, \*0404 e \*0408, enquanto aqueles com FR negativo ou fracamente positivo apresentavam apenas tendência para aumento de DRB1\*0404, \*0101 e \*0102.

Neste trabalho, os pacientes com AR apresentaram maior frequência de HLA-DR1 e os pacientes com HLA-DR4 evidenciaram uma associação à doença mais grave. O que existe em comum entre o HLA-DR1 e o HLA-DR4 é a sequência semelhante de aminoácidos na terceira região hipervariável, nas posições 70 a 74, denominadas QKRAA ou QRRAA, da cadeia DR beta. Esta observação formou a base para a hipótese das sequências semelhantes de aminoácidos ("shared epitope"), que está associada à suscetibilidade para AR. Assim, os elementos estruturais codificados por esta sequência de aminoácidos estão envolvidos no desencadeamento da doença. Neste estudo, os alelos da região HLA-DRB1 mais frequentemente observados foram os alelos HLA-DRB1\*0101, \*0401 e \*0404. A posição dos aminoácidos na região 70 a 74 é idêntica para os alelos HLADRB1\*0404 e \*0101 (QRRAA), com arginina na posição 71, enquanto que para o HLA-DRB1\*0401 (QKRAA) a lisina ocupa a posição 71, sugerindo que os pacientes com sequência QKRAA (\*0401) apresentam doença mais agressiva (WEYAND et al., 1995).

Isto não foi confirmado no presente estudo, onde se verificou que tanto o HLA-DRB1\*0401 (QKRAA) como o \*0404 (QRRAA) apresentaram doença agressiva, sem diferença significativa entre si, excetuando-se a relação entre altos títulos de FR e HLADRB1\*0404.

O trabalho realizado por NELSON et al. (1991) demonstrou que, dos 15 alelos do HLA-DR4, apenas DRB1\*0401 e DRB1\*0405 estavam associados a risco para AR e que o DRB1\*0404 não era um fator de risco independente, ou seja, para estar associado à AR o DRB1\*0404 necessitava ocorrer juntamente com DRB1\*0401 ou DRB1\*0101, o que está de acordo com os achados de GAO et al. (1990), que não encontraram associação do DRB1\*0404 à AR. No entanto, isto está em desacordo com os achados de WORDSWORTH et al. (1992) e RONNINGEN et al. (1992), que concluíram em seus experimentos que os subtipos do HLA-DR4 (DRB1\*0401, \*0404 e \*0405), os quais apresentam seqüências semelhantes nos alelos da terceira região hipervariável, estão independentemente associados à AR, e que o HLA- DRB1\*0404 relaciona-se a esta doença, mesmo quando está presente em um genótipo que não inclui os alelos DR4 ou DR1 no outro haplótipo. Isto também foi verificado no presente trabalho, onde se observou oito pacientes com DRB1\*0404, independentemente do DRB1\*0401 e \*0101 e apenas um outro paciente com ambos os alelos (DRB1\*0404 e \*0101).

Dois pacientes apresentaram positividade para os HLA-DR1 e DR4, um deles com alelos \*0101-0404. Um outro apresentou dois alelos para o HLA-DR1 (\*0101-0102). Esses três apresentaram doença mais agressiva, com altos títulos de FR, presença de erosões e pior estado funcional. Não obstante o pequeno número de pacientes, estes dados estão em concordância com o trabalho de WORDSWORTH et al. (1992) que sugerem que, os pacientes que apresentam dois alelos da seqüência semelhante de aminoácidos evoluem com doença mais agressiva. A freqüência aumentada de doença mais erosiva em pacientes com seqüências semelhantes de aminoácidos e positividade para o FR foi observada por GAO et al. (1990b) que selecionaram, a partir desses dados, os pacientes com AR no início da doença que evoluiriam de maneira mais destrutiva.

Ao agrupar os pacientes com HLA-DRB1\*0101, 0401 e 0404, que possuem seqüências semelhantes de oligonucleotídeos, na região 70-74 (QKRAA / QRRAA) e comparando-os com os demais, verificou-se que apresentavam aumento significativo de erosões ósseas, porém, em relação aos títulos de FR e graus da CFS, não se encontrou diferença significativa. Essa associação da seqüência semelhante de oligonucleotídeos à artrite mais erosiva também foi constatada por MORENO et al. (1996).

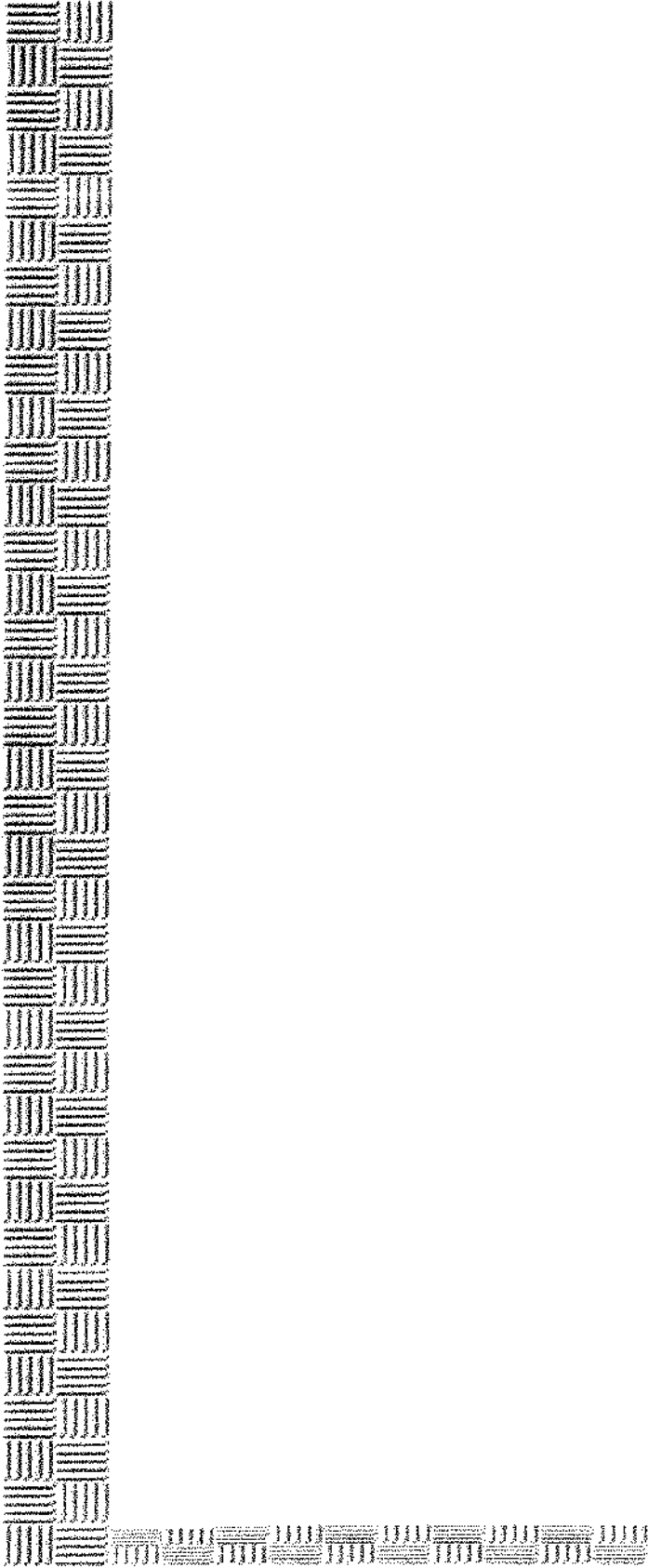
Tais resultados indicam que, a genotipagem dos alelos HLA-DRB1 identifica os pacientes com AR no início da doença, quando ainda não ocorreram erosões ósseas e deformidades, ou seja, na fase precoce, pré erosiva da doença. Os pacientes deste estudo, que tinham mais lesões erosivas apresentaram os alelos HLA-DRB1\*0401 e \*0404, portanto, os pacientes com início da doença que apresentem esses alelos devem ser tratados com drogas mais potentes, antes que se iniciem as lesões erosivas. Isto pode ser fundamentado pelo trabalho de NEPON et al. (1996) que indicam terapêutica precoce para os doentes que possuem um ou mais alelos do HLA-DR4 (DRB1\*0401,\*0404), pois avaliando pacientes com erosão óssea progressiva, observaram que cerca de 70 a 80% carregam um ou mais desses alelos. Entretanto, em outro estudo, EBERHARDT et al. (1996), apesar de terem concluído que os pacientes com seqüência semelhante de oligonucleotídeos (HLA-DRB1\*0401 e \*0404) apresentam forte associação à AR, não demonstraram que a genotipagem se associou à gravidade da doença ,após dois e cinco anos de evolução, questionando, assim, o valor da tipagem genômica na seleção de pacientes para introdução de terapêutica precoce e agressiva. SUAREZ-ALMAZOR et al. (1995), da mesma forma, encontraram associação apenas à suscetibilidade à doença, porém somente naqueles com positividade do FR, não servindo, essas seqüências semelhantes de aminoácidos, como marcador de agressividade da doença.

Apesar de ter sido estudada população caucasóide, a etnia da população brasileira é heterogênea, pois inclui descendentes de portugueses, espanhóis e italianos, entre outros. Além disto, muitos indivíduos têm origens étnicas mescladas, o que pode explicar algumas diferenças entre os achados deste trabalho e os de outros, principalmente os estudos europeus, onde se apresentam grupos etnicamente mais homogêneos.

Em conclusão, neste trabalho os pacientes apresentaram maior frequência de HLA-DR1, porém, quando presente o HLA-DR4, a evolução da doença tende a ser mais agressiva. Quanto aos subtipos do HLA-DR1 observou-se uma tendência para erosões ósseas com o HLA-DRB1\*0101 e, com relação aos subtipos de DR4, ambos os alelos HLA-DRB1\*0401 e 0404 estão associados à agressividade da doença. A presença destes alelos pode caracterizar um subgrupo de alto risco para doença reumatóide de evolução menos favorável.

A abordagem atual dos pacientes com AR deve incluir, não somente exames clínicos e laboratoriais minuciosos, como também o estudo dos antígenos de histocompatibilidade, que pode fornecer subsídios para terapêutica precoce e mais agressiva. Com a identificação das seqüências semelhantes dos aminoácidos nas moléculas de classe II, a imunomodulação com a finalidade de tratar as doenças auto-imunes, como a AR, vem-se tornando mais consistente, podendo-se atuar a nível dos receptores de células T, peptídeos e moléculas de classe II. Identificando-se peptídeos que se liguem especificamente no sítio de ligação das moléculas DR, com seqüência semelhante na AR, esses peptídeos podem ser capazes de bloquear a apresentação dos peptídeos artritogênicos e modularem a resposta auto-imune.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular reconhece as influências dos genótipos no desencadeamento da AR e pode participar na melhor compreensão da patogênese da doença, contribuir para o diagnóstico mais adequado, prever suscetibilidade, mas, principalmente, colaborar para que se possa atuar efetivamente modificando o prognóstico, através de uma terapêutica mais seletiva e eficaz.



## ***6. Conclusões***

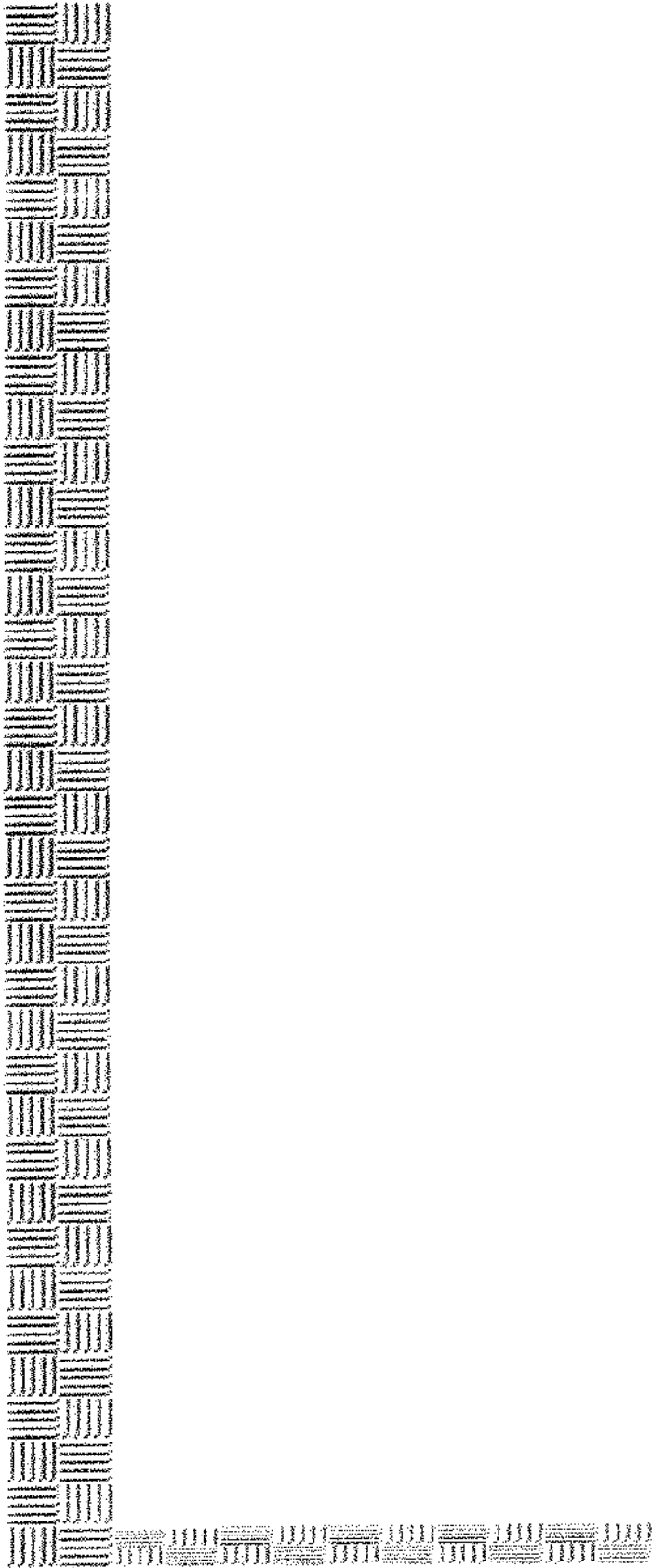
1. O antígeno de histocompatibilidade HLA-DR1 foi encontrado com mais frequência entre os pacientes deste estudo.

2. O antígeno de histocompatibilidade HLA-DR4 não apresentou frequência aumentada em relação ao grupo controle, contudo, estava presente naqueles com maior frequência de erosões, títulos de FR mais elevados e pior classificação funcional, estando, portanto, associado à doença mais agressiva.

3. Nos pacientes HLA-DR1 positivo, o alelo HLA-DRB1\*0101 foi o mais freqüente e esteve associado à presença de erosões quando comparado ao alelo HLA-DRB1\*0102.

4. Os subtipos do HLA-DR4, HLADRB1\*0401 e \*0404 apresentaram associação à doença mais agressiva, sendo o alelo HLA-DRB1\*0404 o mais freqüente.

5. Os pacientes com os alelos HLA-DRB1\*0101, \*0401 e \*0404, que possuem seqüências semelhantes de aminoácidos na região 70-74 (QKRAA-QRRAA), apresentavam mais lesões erosivas, o que indica agressividade. Portanto, a seqüência semelhante de aminoácidos se relacionou a pior prognóstico.



## *7. Summary*



Several reports have shown that rheumatoid arthritis (RA) is associated with HLA-DR4, however association of RA and HLA-DR1 has been found also in caucasian population. Subsets of HLA-DR4 were recognized using molecular biology technics. It has been mentioned that DR4 alleles (HLA-DRB1\*0401,\*0404,\*0405) are more associated with severity than susceptibility to the disease.

Our goals were to determine the HLA-DR frequency, to identify the specific alleles of HLA-DRB1, to correlate these alleles with the clinical and laboratorial manifestations and to determine the alleles that can identify patients with more aggressive disease in caucasian with rheumatoid arthritis.

Sixty five caucasian patients with RA (ACR's criteria) were analyzed with clinical, serological, radiographic data and functional status according to the Steinbrocker scale. To determine Class I and II antigens the microinfocitotoxicity reaction was employed. Genomic DNA from HLA-DR1 and DR4 positive patients was amplified by the polymerase chain reaction (PCR). Dot blotting and hybridization with sequence specific oligonucleotide (SSO) probes were performed.

The phenotypic frequency of HLA-DR1 in RA patients (26,2%) was significantly greater than controls (11,5%) ( $p < 0,05$ ). HLA-DR4 occurred in 24,6% of the patients and in the 18% of controls ( $p > 0,05$ ). The HLA-DR1 positive patients did not show differences when compared to HLA-DR1 negative. Positive DR4 patients had significantly higher titres of rheumatoid factor, bone erosions and worst functional status ( $p < 0,05$ ). The alleles HLA-DRB1\*0401 e \*0404 were associated with worst functional status, bone erosions and rheumatoid factor. HLA-DRB1\*0101 and \*0102 were the most frequent alleles, however not associated with clinical and laboratory characteristics.

Those with HLA-DRB1\*0101, \*0401 e \*0404 alleles, who presented de shared epitope (QKRAA - QRRAA) at position 70-74, showed erosion more frequently.

We can conclude that the HLA-DRB1\*0101 and \*0102 alleles are associated with susceptibility to RA while \*0401 and \*0404 with more aggressive disease.



## ***8. Referências bibliográficas***

- AHO, K.; PALUSUO, T.; KURKI, P. - Marker antibodies of rheumatoid arthritis: diagnostic and pathogenetic implications. **Semin. Arth. Rheum.**, 23:379-87, 1994.
- ALARCON, G.S. - Epidemiology of rheumatoid arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, 21:589-604, 1995.
- ALARCON, G.S.; KOOPMAN, W.J.; ACTON, R.T.; BARGER, B.O. - Seronegative rheumatoid arthritis: a distinct immunogenetic disease? **Arthritis Rheum.**, 25:502-7, 1982.
- ANDRADE, L.E.C. - Princípios teóricos e básicos em biologia molecular. **Rev. Bras. Reum.**, 33:31-41, 1993.
- ARNETT, F.C.; EDWORTHY, S.M.; BLOCH, D.A.; McSHANE, D.J.; FRIES, J.F.; COOPER, N.S.; HEALEY, L.A.; KAPLAN, S.R.; LIANG, M.H.; LUTHRA, H.S.; MEDSGER, T.A.; MITCHELL, D.M.; NEUSTADT, D.H.; PINALS, R.S.; SCHALLER, J.G.; SHARP, J.T.; WILDER, R.L.; HUNDER, G.G. - The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of the rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, 31:315-24, 1988.
- BARDIN, T.; LEGRAND, L.; NAVEAU, B.; MARCELLI-BARGE, M.; DEBEYRE, N.; LATHROP, G.M.; POIRIER, J.C.; SCHIMID, M.; RICKEWAER, A. DRYLL, A. - HLA antigens and seronegative rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 44:50-3, 1985.
- BENAZET, J.F.; REVIRON, D.; MERCIER, P.; ROUX, H.; ROUDIER, J.- HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in southern France. Absence of extraarticular disease despite expression of the shared epitope. **J. Rheumatol.**, 22:607-10, 1995.
- BENSEN, W.G.; BENSEN, W.; ADACHI, J.D. TUGWELL, P.X. - Remodelling the pyramid: The therapeutic target of rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, 17:987-9, 1990.

- BIDWELL, J. - Advances in DNA-based HLA-typing methods. **Immunology Today**, 15:303-7, 1994.
- BJORKMAN, P.J. & PARHAM, P. - Structure, function and diversity of class II major histocompatibility complex molecules. **Ann. Rev. Biochem.** 59:253-88, 1990.
- BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROP, R.E.; CHARRON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A. MACH, B.; MAYR, W.R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M.T. STROMINGER, J.L. SVJGAARD, A.; TERASAKI, P.I. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. **Tissue Antigens**, 46:1-18, 1995.
- BOEY, M.L.; WEE, G.B.; MOHAN, C.; HOWE, H.S.; CHAN, S.H.; FENG, P.H. - HLA in Singapore chinese with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, 19:1517-9, 1992.
- BOKI, K.A.; DROSOS, A.A.; TZIOUFAS, A.G.; LANCHBURY, J.S.; PANAYI, G.S.; MOUTSPOULOS, H.M. - Examination of HLA-DR4 as a severity marker for rheumatoid arthritis in Greek patients. **Ann. Rheum. Dis.**, 52:517-19, 1993.
- BREWERTON, D.A.; CAFFREY, M.; HART, F.D.; JAMES, D.C.O.; NICHOLLS, A.; STURROCK, R.D. - Ankylosing spondylitis and HLA-A 27. **Lancet**, 1:904-7, 1973.
- BROWN, J.H.; JARDETZKY, T.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BJORKMAN, P.J.; WILEY, D.C. - A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. **Nature**, 332:845-50, 1988.
- BRODSKY, F.M.; LEM, L.; BRESNAHAN, P.A.-Antigen processing and presentation. **Tissue Antigens**, 47:464-71, 1996.
- CALIN, A.; ELSWOOD, J.; KLOUDA, P.T. - Destructive arthritis, rheumatoid factor, and HLA-DR4. **Arthritis Rheum.**, 32:1221-5, 1989.

- CAMPBELL, R.D. & TROWSDALE, J. - Map of the human MHC. **Immunology Today**, 14:349-352, 1993.
- CECERE, F.A. & PERSELIN, R.H. - The interaction of pregnancy and the rheumatic diseases. **Clin. Rheum. Dis.**, 7: 747-68, 1981.
- CHAN, K-W.A.; FELSON, D.T.; YOOD, R.A.; WALKER, A.M. - Incidence of rheumatoid arthritis in central Massachusetts. **Arthritis Rheum.**, 36:1691-6, 1993.
- COSTA, F.F. & COSTA, S.C.B. - Reações em cadeia de polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. **Rev. Bras. Reumatol.**, 32:142-6, 1992.
- COSTA, F.F.; FIGUEIREDO, M.S.; SONATI, M.F.; KIMURA, E.M.; MARTINS, C.S.B. - The IVS 1-110 and codon 39 beta thalassemia mutations en association with alpha thal 2 (-37 kb) and Hb Hasharon in a brazilian patient. **Hemoglobin**, 16:525-8, 1992.
- CUTOLO, M.; BALLEARE, E.; GIUSTI, M.; MONACHESI, M.; ACCARDO, S. - Sex hormone status of male patients with rheumatoid arthritis: Evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline and after human chorionic gonadotropin stimulation. **Arthritis Rheum.**, 31:1314-17, 1988.
- DAUSSET, J. - HLA complexe majeur d'histocompatibilite de l'homme. 1.ed. Paris , Flammarion Médecine Sciences, 1985. 411p.
- DEL PUENTE, A.; KNOWLER, W.C.; PETTITT, D.J.; BENETT, P. - High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians. **Am. J. Epidemiol.**, 129:1170-8, 1989.
- EBERHARDT, K.; FEX, E.; JOHNSON, U.; WOLHEIM, F.A. Association of HLA DRB and DQB genes with 2 and 5 year outcome in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 55:34-9, 1996.

- EBERHARDT, K.; GRUBB, R.; JOHNSON, U.; PETTERSSON, H. - HLA-DR antigens, Gm allotypes and antiallotypes in early rheumatoid arthritis - Their relation to disease progression. **J. Rheumatol.**, **20**:1825-9, 1993.
- EVANS, T.I.; HAN, J.; SINGH, R.; MOXLEY, G. - The genotypic distribution of shared-epitope DRB1 alleles suggests a recessive mode of inheritance of the rheumatoid arthritis disease-susceptibility gene. **Arthritis Rheum.**, **38**: 1754-61, 1995 .
- FUCHS, H.A.; KAYE, J.J.; CALLAHAN, L.F.; NANCE, E.P.; PINCUS, T. - Evidence of significant radiographic damage in rheumatoid arthritis within the first 2 years of disease. **J. Rheumatol.**, **16**:585-91, 1989.
- GAO, X.; BALL, E.J.; DOMBRAUSKY, L.; OLSEN, N.J.; PINCUS, T.; KHAN, M.A.; WOLFE, F.; STASTNY P. - Class II human leukocyte antigen genes and T cell receptor polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. **Am. J. Med.**, **23**:14-16, 1988.
- GAO, X.; FERNANDEZ-VINA, M.; SHUMWAY, W.; STASTNY, P. - DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. I. Typing for subsets of HLA-DR4. **Hum. Immunol.**, **27**:40-50, 1990c.
- GAO, X.; GAZIT, E.; LIRNCH, A.; STASTNY, P. - Rheumatoid arthritis in israeli jews, association with two sequences shared by several DRB1 alleles in the third hypervariable region. **Human Immunol.**, p69, 1990a. (abstract)
- GAO, X.; OLSEN, N.J.; PINCUS, T.; STASTNY, P. - HLA-DR alleles with naturally occurring amino acid substitutions and risk for development of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, **33**:939-46, 1990b.
- GERMAIN, R.N. - Major histocompatibility complex-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell**, **76**: 287-99, 1994.

- GORDON, D.A.; STEIN, J.L.; BRODER, I. - The extrarticular features of rheumatoid arthritis: A systematic analysis of 127 cases. **Am. J. Med.**, 54:445-52, 1973.
- GORODESKY, C.; LAVALLE, C.; CASTRO-ESCOBAR, L.E.; MIRANDA-LIMON, J.M.; ESCOBARR-GUTIERR, P. - HLA antigens in Mexican patientes with adult rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, 24:976-7, 1981.
- GOUGH, A.; FAINT, J.; SALMON, M.; HASSEL, A.; WORDSWORTH, P.; PILLING, D.; BIRLEY, A.; EMERY, P. Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome. **Arthritis Rheum.**, 37:1166-70, 1994.
- GREGERSEN, P.K. - T-cell receptor-major histocompatibility complex genetic interactions in rheumatoid arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, 18: 793-7, 1992.
- GUAL, R.M.R.; CARVALHO, I.F.; VOLTARELLI, J.C.; DONADI, E.A. - Artrite reumatóide juvenil: aspectos clínicos e imunogenéticos de uma casuística de pacientes brasileiros. **Rev. Bras. Reumatol.**, 36:115-19, 1996.
- 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.**, 30:1205-1213, 1987.
- 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.**, 49:744-6, 1990.
- HARRIS, E.D. - Rheumatoid Arthritis: Pathophysiology and implications for therapy. **N. Engl. J. Med.**, 322:1277-89, 1990.
- HARRIS, E.D. - The rationale for combination therapy of rheumatoid arthritis based on pathophysiology. **J. Rheumatol.**, 23(suppl 44):2-4, 1996.

- HIRAIWA, A.; YAMANAKA, K.; KWOK, W.W.; MICKELSON, E.M.; MASEWICZ, S.; HANSEN, J.A.; RADKA, S.F.; NEPOM, G.T. - Structural requirements for recognition of the HLA-Dw14 class II epitope - a key HLA determinant associated with rheumatoid arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**:8051-5, 1990.
- HOLMDAHL, R.; KLARESKOG, L.; ANDERSSON, M.; HANSEN, C. - High antibody response to autologous type II collagen is restricted to H-2q. **Immunogenetics**, **24**:84-9, 1986.
- JANEWAY, C.H. & TRAVERS, P. - **IMMUNO BIOLOGY**. 1.ed. New York, Garland Publishing Inc, 1994.
- JARAQUEMADA, D.; OLLIER, W.; AWAD, J.; YOUNG, A.; SILMAN, A.; ROITT, I.M.; CORBETT, M.; HAY, F.; COSH, J.A.; MAINI, R.N.; VENABLES, P.J.; ANSELL, B.; HOLBOROW, J.; REEBACK, J.; CURREY, H.L.F.; FESTENSTEIN. - HLA and rheumatoid arthritis: A combined analysis of 440 british patients. **Ann. Rheum. Dis.**, **45**:627-36, 1986.
- JAWAHEER, D.; THOMSON, W.; MACGREGOR, A.J.; CARTHY, D.; DAVIDSON, J.; DYER, P.A.; SILMAN, A.J.; OLLIER, W.E.R. - Homozigosity for the HLA-DR shared epitope contributes the highest risk for rheumatoid arthritis concordance in identical twins. **Arthritis Rheum.**, **37**:681-6, 1994.
- KAARELA, K.; ALEKBEROVA, Z.; LEHTINEN, K.; PUOLAKKA, K.; KOSKIMIES, S.; NASSONOVA, V.; POSPELOV, L. Seronegative rheumatoid arthritis: a clinical study with HLA typing. **J Rheumatol.**, **17**: 1125-9, 1990.
- KARR, R.W.; RODY, J.E.; LEE, T.; SCHWARTZ, B.D. - Association of HLA-DRw4 with rheumatoid arthritis in black and white patients. **Arthritis Rheum.**, **23**:1241-5, 1980.



- KIM, H-Y.; KIM, T-G.; PARK S-H.; LEE, S-H.; CHO, C-S. - Predominance of HLA-DRB1\*0405 in Korean patients with rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, **54**:988-990, 1995.
- KLARESKOG, L.; FORSUM, U.; MALLMNAS; TJERLUND, D.; KABELITZ, D.; WIGREN, A. - Appearance of anti-HLA-DR reactive cells in normal and rheumatoid synovial tissue. **Scand. J. Immunol.**, **14**:183-92, 1981.
- 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.**, **15**:501-7, 1982.
- KLARESKOG, L.; HOLMDAHL, R.; LARSSON, E.; WIGZELL, H. - Role of T lymphocytes in collagen II induced arthritis in rats. **Clin. Exp. Immunol.**, **51**:117-25, 1983.
- KLARESKOG, L.; RONNELID, J.; HOLM, G. - Immunopathogenesis and immunotherapy in rheumatoid arthritis: an area in transition. **J. Intern. Med.**, **238**:191-206, 1995.
- LANCHBURY, J.S.S.; HALL, M.A.; WELSH, K.I.; PANAYI, G.S. - Sequence analysis of H LA-DR4B1 subtypes: additional first domain variability is detected by oligonucleotide Hybridization and nucleotide sequencing. **Hum Immunol.**, **27**: 136-44, 1990.
- LAWRENCE, J.S. & BALL, J. - Genetic studies on rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, **17**:160-8, 1958.
- LINOS, A.; WORTHINGTON, J.W.; O'FALLON, W.M.; KURLAND, L. - The epidemiology og rheumatoid arthritis in Rochester Minnesota: A study of incidence, prevalence and mortality. **Am. J. Epidemiol.**, **111**:87-98, 1980.

- MacGREGOR, A.; OLLIER, W.; THOMSON, W.; JAWAHEER, D.; SILMAN, A. - HLA-DRB1\*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. **J Rheumatol.**, **22**: 1032-1036, 1995.
- MARQUES NETO, J.F.; GONÇALVES, H.T.; LANGEN, L.F.O.B.; CUNHA, M.F.L.; RADOMINSKI, F.; OLIVEIRA, S.M.; CURY, S.E.; MEDEIROS, F.; SAMPAIO, G. - Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide no adulto em amostras da população brasileira. **Rev. Bras. Reum.**, **33**:169-73, 1993.
- MARTENS, H.F.; SHEETS, O.K.; TENOVER, J.S.; DUGOWSON, C.E.; BREMMER, W.J.; STARKEBAUM, G. - Decreased testosterone levels in men with RA: Effects of low dose prednisone therapy. **J. Rheumatol.**, **21**:1427-31, 1994.
- MASI, A.T.; FEIGENBAUM, S.L.; CHATTERTON. - Hormonal and pregnancy relationships to rheumatoid arthritis: Convergent effects with immunologic and microvascular systems. **Semin. Arthritis Rheum.**, **25**:1-27, 1995.
- MASSARDO, L.; AGUIRRE, V.; GARCÍA, M.E.; CERVILLA, V.; NICOVANI, S.; GONZÁLEZ, A.; RIVERO, S.; JACOBELLI, S. Clinical expression of rheumatoid arthritis in Chilean patients. **Semin. Arthritis Rheum.**, **25**:203-13, 1995.
- MASSARDO, L.; JACOBELLI, S.; RODRIGUEZ, C.; RIVERO, S.; GONZALES, A.; MARCHETTI. - Weak association between HLA-DR4 and rheumatoid arthritis in Chilean patients. **Ann. Rheum. Dis.**, **49**:290-2, 1990.
- McCARTY, D. Methods for evaluating rheumatoid arthritis. in: Arthritis and allied conditions. 8a. ed. p. 419-438.
- McDANIEL, D.O.; ALARCON, G.S.; BARGER, B.O. - Sequence analysis of HLA-DR4 subtypes in american blacks with rheumatoid arthritis. **Human Immunology**, p36, 1990. (Abstract)

- MORENO, I. VALENZUELA, A.; GARCIA, A.; YÉLAMOS, J.; SÁNCHEZ, B.; HERNANZ, W. - Association of the shared epitope with radiological severity of rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, **23**:6-9, 1996.
- NAGASHIMA, M.; YOSHINO, S.; ISHIWAT, A.T.; ASANO, G. - Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, **22**:1624-1630, 1995.
- NELSON, J.L.; DUGOWSON, C.E.; KOEPESELL, T.D.; VOIGT, L.F.; BRANCHAUD, A.M.; BARRINGTON, R.A.; WENER, M.H.; HANSEN, J.A. - Rheumatoid factor, HLA-DR4, and allelic variants of DRB1 in women with recent-onset rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, **37**:673-80, 1994.
- NELSON, J.L.; MICKELSON, E.; MASEWICZ, S.; BARRINGTON, R.; DUGOWSON, C.; KOEPESELL, T.; HANSEN, J.A. - DW14 (DRB1 \*0404) is a Dw4 dependent risk factor for rheumatoid arthritis: rethinking the "shared epitope" hypothesis. **Tissue Antigens** **38**:145-52, 1991.
- NEPOM, G.T.; BYERS, P.; SEYFRIED, C.; HEALEY, L.A.; WILSKE, K.R.; STAGE, D.; NEPOM, B.S. - HLA genes associated with rheumatoid arthritis: Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. **Arthritis Rheum.**, **32**:15-21, 1989.
- NEPOM, G.T.; GERSUK, V.; NEPOM, B.S. - Prognostic implications of HLA genotyping in the early assessment of patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, **23**(suppl 44):5-9, 1996.
- NEPOM, G.T.; SEYFRIED, C.E.; HOLBECK, S.L.; WILSKE, K.R.; NEPOM, B.S. Identification of HLA-DW14 genes in DR4 + rheumatoid arthritis. **Lancet**, **2**:1002-4, 1986.
- NEPOM, B.S. & NEPOM, G.T. - Polyglot and Polymorphism. **Arthritis Rheum.**, **38**: 1715-21, 1995.

- NEPOM, G.T. & NEPOM, B.S. - Prediction of susceptibility to rheumatoid arthritis by human leukocyte antigen genotyping. **Rheum. Dis. North. Am.**, 18:785-92, 1992.
- NICHOL, F. E. & WOODROW, J. - HLA-DR antigens in Indian patients with rheumatoid arthritis. **Lancet**, 1:220-1, 1981.
- OHTA, N.; NISHIMURA, Y.K.; TANIMOTO, K.; HORIUCHI, Y.; ABE, C.; SHIOKAWA, Y.; ABE, T.; KATAGIRI, M.; YOSHIKI, T.; SASAZUKI, T. - Association between HLA and Japanese patients with rheumatoid arthritis. **Hum Immunol.**, 5: 123-32, 1982.
- OLLIER, W.E.R.; SPECTOR, T.; SILMAN, A.; PERRY, L.; ORD, J.; THOMSON, W.; FERTENSTEIN, H. - Are certain HLA haplotypes responsible for low testosterone in males. **Dis. Markers**, 7:139-43, 1989.
- OLLIER, W.E.R.; STEPHENS, C.; AWAD, J.; CARTHY D.; GUPTA, A.; PERRY, D.; JAWAD, A.; FESTENSTEIN, H. - Is rheumatoid arthritis in Indians associated with HLA antigens sharing a DR $\beta$ 1 epitope? **Ann Rheum Dis.**, 50:295-7, 1991.
- OLLIER, W.E.R. & THOMSON, W. - Population genetics of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am.**, 18: 741-59, 1992.
- OLSEN, N.J.; CALLAHAN, L.F.; BROOKS, R.H.; NANCE, E.P.; KAYE, J.J., STASTNY, P.; PINCUS, T. - Associations with rheumatoid factor and radiographic severity in rheumatoid arthritis. **Am. J. Med.**, 84:257- 64, 1988.
- OLSEN, N.J.; STASTNY, P.; JASIN, H.E. - High levels of in vitro IgM rheumatoid factor synthesis correlate with HLA-DR4 in normal individuals. **Arthritis Rheum.**, 30:841-8, 1987.
- O'SSULIVAN, J.B.; CATHCART, E.S.; BOLZAN, J.A. - Population studies of the rheumatic diseases. in: Excerpta Medica foundation, 1968, p109.

- PAULUS, H.E. & BULPITT, K.J. - Outcome measures. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, **21**:605-618, 1995.
- PAYAMI, H.; THOMSON, G.; KHAN, M.A.; GRENNAN, D.M.; SANDERS, P.; DYER, P.; DOSTAL, C. - Genetics of rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, **27**:57-63, 1986.
- PINCUS, T. & CALLAHAN, L.F. - What is the natural history of rheumatoid arthritis? **Rheum. Dis. North Am.**, **19**:123-51, 1993.
- PLOSKI, R.; MELLBYE, O.J.; RONNINGEN, K.S.; FO RRE, O.; THORSBY, E. - Seronegative and weakly seropositivenrheumatoid arthritis differ from clearly seropositive rheumatoid arthritis in HLA class II associations. **J. Rheumatol.**, **21**:1397-402, 1994.
- QUEIROS, M.V.; SANCHO, M.R.H.; CAETANO, J.M. - HLA-DR4 antigen and IgM rheumatoid factors. **J. Rheumatol.**, **9**:370-3, 1982.
- RONNELID, J.; LYSHOLM, J.; ENGSTROM-LAURENT, A.; KLARESKOG, L.; HEYMAN, B. - Local anty-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4 restricted IgG response. **Arthritis Rheum.**, **37**:1023-9, 1994.
- RONNINGEN, K.S.; PLOSKI, R.; HANSEN, T.; THORSBY, E. - Dw14 is a Dw4 independent risk factor for rheumatoid arthritis among Norwegians. **Tissue Antigens** **39**:280, 1992.
- RONNINGEN, K.S.; SPURKLAND, A.; EGELAND, T.; IWE, T.; MUNTHE, E.; VARTDAL, F.; THORSBY, E. - Rheumatoid arthritis may be primarily associated with HLA-DR4 molecules sharing a particular sequence at residues 67-74. **Tissue Antigens**, **36**:235-40, 1990.
- ROOK, G.A.W. - Is rheumatoid arthritis caused by an infection. **Rev. Bras. Reumatol.**, **33**:211-4, 1993. [Editorial]

- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. - Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**:487-92, 1988.
- SALVARANI, C.; MACCIONI, P.; MANTOVANI, W.; ROSSI, F.; VENEZIANI, M.; BOIARDI, L.; LODI, L.; PORTIOLI, I. - Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis and HLA antigens in northern Italy. **J.Rheumatol.**, **19**:242-6, 1992.
- SAMARA, A.M. & MARQUES NETO, J.F. - Artrite Reumatóide in: SAMARA, A.M. - **Reumatologia**. São Paulo. Sarvier, 1985. p.115-83.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. - **Molecular cloning, a laboratory manual**. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor, 1989.
- SANCHEZ, B.; MORENO, I.; MAGARINO, R.; GARZON, M.; GONZALES, M.F.; GARCIA, A.; NUNEZ, A.R. - HLA-DRw10 confers the high susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population. **Tissue Antigens**, **36**:174-6, 1990.
- SATTAR, M.A.; AL-SAFFAR, M.; GUINDI, R.T.; SUGATHAN, T.N.; BEHBEHANI, K. - Association between HLA-DR antigens and rheumatoid arthritis in arabs. **Ann. Rheum. Dis.**, **49**:147-9, 1990.
- SCHAARDENBURG, D. & BREEDVELD, F.C. - Elderly-onset rheumatoid arthritis. **Semin. Arthr. Rheum.**, **23**:367-78, 1994.
- SCHARF, S.J.; GRIFFITH, R.L.; ERLICH. - Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. **Human. Immunol.**, **30**:190-201, 1991.
- SCHIFF, B.; MIZRACHI, Y.; ORGAD, S.; YARON, M.; GAZIT, E. - Association of HLA-AW31 and HLA-DR1 with adult rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, **41**:403-5, 1982.

- SCHLOSSTEIN, L.; TERASAKI, P.I.; BLUESTOWE, R.; PEARSON, G.M. - High association of an HLA antigen, w27, with ankylosing spondylites. **New Engl. J. Med.**, **288**:704-6, 1973.
- SPECTOR, T.D. - Rheumatoid arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, **16**:513-37, 1990.
- SPECTOR, T.D. & HOCHBERG, M.C. - The protective effect of the oral contraceptive pill on rheumatoid arthritis. **J. Clin. Epidemiol.**, **43**:1221-30, 1990.
- STASTNY, P. - Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. **N.Engl. J. Med.**, **298**:869-71, 1978.
- STASTNY, P. - Mixed lymphocytes cultures in rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, **57**:1148-57, 1976.
- STASTNY, P.; BALL, E.J.; KHAN, M.A.; OLSEN, N.J.; PINCUS, T.; GAO, X. - HLA-DR4 and other genetic markers in rheumatoid arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, **27**:132-8, 1988.
- STEINBROCKER, O.; TRAEGER, C.H.; BATTERMAN, R.C. - Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. **J.A.M.A.**, **140**:659-62, 1949.
- STRACHAN, T. - Molecular genetics and polymorphism of class I antigens. **Br. Med. Bull.**, **43**:1-14, 1987.
- SUAREZ-ALMAZOR, M.E.; TAO, S.; MOUSTARAH, F.; RUSSEL, A.S.; MAKSYMOWYCH, W. - HLA-DR1, DR4, and DRB1 disease related subtypes in rheumatoid arthritis. Association with susceptibility but not severity in a city wide community based study. **J. Rheumatol.**, **22**:2027-33, 1995.
- SVEJGAARD, A. & RYDER, L.P. - Disease associations. In: KISSMEYER-NIELSE, F. - **Histocompatibility Techniques**. 1979. P.185-205.

- TANEJA, V.; MEHRA, N.K.; ANAND, C.; MALAVIYA, A.N. - HLA-linked susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, **36**:1380-6, 1993.
- TERMIJTELEN, A.; ERLICH, H.A.; BRAUN, L.A.; VERDUYN, W.; DRABELS, J.J.; SCHROEJERS, W.G.; VAN ROOD, J.J.; KOSTERS, H.S.; GIPHART, M.J. - Oligonucleotide typing is a perfect tool to identify antigens stimulatory in the mixed lymphocyte culture. **Human. Immunol.**, **31**:241-5, 1991.
- THOMSON, W.; PEPPER, L.; PAYTON, A.; CARTHY, D.; SCOTT, D.; OLLIER, W.; SILMAN, A.; SYMMONS D. - Absence of an association between HLA-DRB1\*04 and rheumatoid arthritis in newly diagnosed cases from the community. **Ann Rheum Dis.**, **52**: 539-41, 1993.
- TIWARI, J.L. & TERASAKI, P.I. - **HLA and disease association.** 1.ed. New York, Springer Velag, 1985.
- TODA, Y.; MINMIKAWA, Y.; AKAGI, S.; SUGANO, H.; MORI, Y.; NISHIMURA, H.; ARITA, S.; SUGINO, Y.; OGAWA, R. - 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.** **53**:587-592, 1994.
- TODD, J.A.; ACHA-ORBEA, H.; BELL, J.I.; CHAO, N.; FRONEK, Z.; JACOB, C.O.; McDERMOTT, M.; SINHA, A.A.; TIMMERMAN, L.; STEINMAN, L.; McDEVITT, H.O. - A molecular basis for major histocompatibility complex class II - associated autoimmunity. **Science**, **240**:1003-1009, 1988.
- TROWSDALE, J.; YOUNG, J.A.T.; KELLY, A.P.; AUSTIN, P.J.; CARSON, S.; MEUNIER, H.; SO, A.; ERLICH, H.A.; SPIELMAN, R.S.; BODMER, J.; BODMER, WF. - Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region. **Immunol. Rev.**, **85**:5-9, 1985.



- 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.**, **54**:654-61, 1995.
- UNGAR, A.; KAY, A.; GRIFFIN, J.A. - Disease activity in rheumatoid arthritis during pregnancy. **Br. Med. J.**, **286**:750-2, 1983.
- VAN ZEBEN, D.; BREEDVELD, F.C. - Prognostic factors in rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol**, **23**(suppl44):31-33, 1996.
- VEHE, R.K.; BEGOVICH, A.B.; NEPOM, B.S. - HLA susceptibility genes in rheumatoid factor positive juvenile rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, **17**:11-4, 1990.
- WESTEDT, M.L.; BREEDVELD, F.C.; SCHREUDER, G.M.T.H.; D'AMARO, J.; CATS, A.; DE VRIES, R.R.P. - Immunogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** **45**:534-8, 1986.
- WEYAND, C.M.; HICOK, K.C.; CONN, D.L.; GORONZY, J.J. - The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. **Ann. Intern. Med.**, **117**:801-6, 1992.
- WEYAND, C.M.; McCARTHY, T.G.; GORONZY, J.J. - Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest.**, **95**: 2120-26, 1995.
- WEYAND, R.K.; HICOK, K.; CONN, D.; ET AL - The role of homozygosity at the HLA-DRB1 locus in determining disease severity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, **34**:S33, 1991. (abstract)
- WILLIAMS, R.C.; JACOBSSON, L.T.H.; KNOWLER, W.C.; PUENTE, A.; KOSTYU, D.; MCAULEY, J.E.; BENETT, P.H.; PETTITT, D.J. - Meta-analysis reveals associations between most common class II haplotype in full heritage native americans and rheumatoid arthritis. **Human. Immunol.**, **42**:90-4, 1995.

- WILLKENS, R.F.; BLANDAU, R.L.; AOYAMA, D.T.; BEASLEY, R.P. - Studies of rheumatoid arthritis among a tribe of Northwest Indians. **J. Rheumatol.**, 3:9-14, 1976.
- WILLKENS, R.F.; HANSEN, J.A.; MALMGREN, J.A.; NISPEROS, B.; MICKELSON, E.M.; WATSON, M.A. - HLA antigens in Yakima indians with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, 25:1435-9, 1982.
- WILLKENS, R.F.; NEPOM, G.T.; MARKS, C.R.; NETTLES, J.W.; NEPOM, B.S. - Association of HLA-Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima indians. **Arthritis Rheum.**, 34:43-7, 1991.
- WINCHESTER, R.; DWYER, E.; ROSE, S. - The genetic basis of rheumatoid arthritis: the shared epitope hypothesis. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, 18:761-83, 1992.
- WOLLHEIM, F. Predictors of joint damage in rheumatoid arthritis. **A.P.M.I.S.**, 104:81-93, 1996.
- WOODROW, J.C.; NICHOL, F.E.; ZAVIROPOULOS, G. - DR antigens and rheumatoid arthritis: a study of two populations. **Br. Med. J.**, 283:1287-90, 1981.
- WORDSWORTH, B.P.; 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**, 32: 413-8, 1990.
- WORDSWORTH, B.P.; LANCHBURY, J.S.S.; SAKKAS, L.I.; WELSH, K.I.; PANAYI, G.S.; BELL, J.I. - HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. **Proc Natl Acad Sci.**, 30: 10049-53, 1989.

- WORDSWORTH, B.P.; PILE, K.D.; BUCKELY, J.D.; LANCHBURY, J.S.S.; OLLIER, B.; LATHROP, M.; BELL, J.I. - HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. **Am. J. hum. Genet.**, 51:585-91, 1992.
- WOULFE, S.L.; BONO, C.P.; ZACHEIS, M.L.; KIRSCHMANN, D.A.; BAUDINO, T.A.; SWEARINGEN, C.; KARR, R.W.; SCHWARTZ, B.D. - Negatively charged residues interacting with the p4 pocket confer binding specificity to DRB1\*0401. **Arthritis Rheum.**, 38: 1744-53, 1995.
- YAMASHITA, T.S.; KHAN, M.A.; KUSHNER, I. - Genetic analysis of families with multiple cases of rheumatoid arthritis. **Dis. Markers**, 4:113-9, 1986.
- YELAMOS, J.; GARCIA-LOZANO, J.R.; MORENO, I.; AGUILLERA, I.; GONZALES, M.F.; GARCIA, A.; NUNEZ-ROLDAM, A.; SANCHEZ, B. - Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1\*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a spanish population. **Arthritis Rheum.**, 36:811-4, 1993.
- YEN, J-H.; CHEN, J-R.; TSAI, W-J.; TSAI, J-J.; LIU, H-W. - HLA DRB1 genotyping in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. **J. Rheumatol.**, 22:1450-4, 1995.
- YOUNG, A.; JARAQUEMADA, D.; AWAD, J.; FERTENSTEIN, H.; CORBETT, M.; HAY, F.C.; ROITT, I.M. - Association of HLA-DR4-Dw4 and DR2-Dw2 with radiologic changes in a prospective study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, 27:20-5, 1984.
- ZALESKI, M.B. - Cell-surface molecules in the regulation of immune responsiveness. **Immunol. Invest.**, 20:103-31, 1991.
- ZVAIFLER, N.J. - Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: McCARTY, D.J. - **Arthritis and allied conditions**. Philadelphia-London. 11.ed. Lea & Febiger, 1989.