



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**ANA ISABEL FERREIRA BATISTA**

***ARTRITE REUMATÓIDE - RELAÇÃO COM HLA-  
DRBI E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO DE  
ANTICORPOS ANTI-CCP***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE REUMATOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSOR DOUTOR ARTUR AUGUSTO PAIVA  
DOUTORA MARIA JOÃO SALVADOR DANIEL SANTOS HENRIQUES**

**03/2012**

**Título:** Artrite Reumatóide – Relação com HLA-DRB1 e seus efeitos na produção de anti-CCP – Artigo de revisão

**Autor:** Ana Isabel Ferreira Batista

**Orientador:** Professor Doutor Artur Augusto Paiva

**Co-orientador:** Doutora Maria João Salvador Daniel Santos Henriques

**Afiliação:** Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Endereço:**

Morada: Rua Fernando Cova Gonçalves, nº1 2040- 185 Rio Maior

Email: alfarrobinha.2@gmail.com

# Índice

---

Abstract .....	2
Resumo.....	4
Introdução.....	6
Métodos.....	8
Desenvolvimento.....	9
1 - Epidemiologia da Artrite Reumatóide .....	9
2 - Etiologia – Que hipóteses existem? Quais os fatores de risco?.....	10
3 – Patogenia da Artrite Reumatóide .....	14
4 – Noções de Fisiopatologia .....	17
5 – O componente genético.....	23
6 – Suscetibilidade/Proteção .....	26
7 – Anticorpos anti-CCP - Fisiopatologia.....	45
8 – Anticorpos anti-CCP e HLA-DRB1 – Existe ligação? .....	47
Conclusões e Perspetivas .....	59
Bibliografia.....	62

## **Abstract**

---

**Introduction:** Rheumatoid arthritis is a chronic autoimmune inflammatory disease that primarily affects synovial joints, although it may also cause extrarticular damage. This disease affects about 1% of the worldwide population. The genetic component of this disease has been studied for years and many hypothesis have been put forward.

**Objectives:** To analyse the association between rheumatoid arthritis and human leucocyte antigen-DRB1 alleles and its influence on susceptibility/protection in the development of this disease.

To determine the connection between human leucocyte antigen-DRB1 alleles and the production of anti-cyclic citrullinated peptides antibodies in patients with rheumatoid arthritis.

**Development:** Of the several genes suggested to be linked to the rheumatoid arthritis pathogenicity, a certain number of human leucocyte antigen-DRB1 alleles were indicated as the major responsables for the genetic etiology of this pathology, and some of them provide susceptibility while others provide protection.

Human leucocyte antigen-DRB1 alleles predisposing for rheumatoid arthritis have an aminoacid sequence, called shared epitope that determines the presentation of particular auto-antigenic peptides to the T cells.

Human leucocyte antigen-DRB1 alleles containing the shared epitope sequence have the ability to bind to citrullinated peptides derived from auto-antigens, then, they are presented to T cells and, therefore, an immune response is stimulated, leading to the production of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies.

**Conclusions:** Some human leucocyte antigen-DRB1 alleles cause susceptibility to the disease, namely the allele \*0401, among others. They share the aminoacid sequence called

shared epitope. The alleles that don't share the referred sequence are considered as protective alleles. The presence of the aminoacid aspartic acid in the 70th position of the third hipervariable region of the DRB1 chain showed a protective tendency. The human leucocyte antigen-DRB1 alleles with the sequence DEERA in the positions 70 to 74 of the third hipervariable region of the DRB1 chain, also demonstrated to be protective against the disease.

The production of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies is associated with human leucocyte antigen-DRB1 alleles, raising the susceptibility to develop rheumatoid arthritis, however, it was not possible to show a direct causal connection between both aspects.

**Keywords:** Rheumatoid Arthritis; HLA-DRB1; *Shared Epitope*; Susceptibility; Anti-cyclic citrullinated peptide Antibodies

## **Resumo**

---

**Introdução:** A artrite reumatóide é uma doença inflamatória auto-imune crônica que afeta em primeiro lugar as articulações sinoviais, embora possa ter, também, manifestações extra-articulares. Esta doença afeta cerca de 1% da população mundial. Desde há muitos anos que se tem vindo a estudar a componente genética ligada a esta doença e já várias hipóteses foram avançadas.

**Objetivos:** Analisar a relação entre a artrite reumatóide e os alelos do locus DRB1 dos antígenos leucocitários humanos e a sua influência na suscetibilidade/proteção que os mesmos exercem no desenvolvimento desta patologia.

Determinar a ligação entre os alelos do locus DRB1 dos antígenos leucocitários humanos e a produção de anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado em doentes com artrite reumatóide.

**Desenvolvimento:** De entre os vários genes apontados como associados à patogénia da artrite reumatóide, um certo número de alelos do locus DRB1 dos antígenos leucocitários humanos foram indicados como os principais responsáveis pela etiologia genética desta patologia, sendo que alguns conferem suscetibilidade e outros conferem proteção.

Os alelos do locus DRB1 dos antígenos leucocitários humanos que predisõem para a artrite reumatóide contêm uma sequência de aminoácidos, chamada *shared epitope*, que determina a apresentação de determinados peptídeos auto-antigénicos aos linfócitos T.

Os alelos do locus DRB1 dos antígenos leucocitários humanos que contêm a sequência *shared epitope* têm a capacidade de se ligar a peptídeos citrulinados derivados de auto-antígenos, seguidamente, estes são apresentados aos linfócitos T e, conseqüentemente, é estimulada uma resposta imunitária, que leva à produção de anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado.

**Conclusões:** Determinados alelos do locus DRB1 dos antígenos leucocitários humanos conferem suscetibilidade à doença, nomeadamente o alelo \*0401, entre outros. Estes partilham a sequência de aminoácidos designada de shared epitope. Os alelos que não possuem a sequência referida, são considerados protetores. A presença do aminoácido ácido aspártico na posição 70 da terceira região hipervariável da cadeia DRB1 mostrou ter uma tendência protetora. Da mesma forma, os alelos do locus DRB1 dos antígenos leucocitários humanos com a sequência DERA nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável demonstraram conferir proteção contra a doença.

A produção de anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado associa-se à presença de alelos do locus DRB1 dos antígenos leucocitários humanos, aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento de artrite reumatóide, no entanto, não foi possível inferir uma relação de causalidade direta entre ambos os fatores.

**Palavras-Chave:** Artrite Reumatóide; HLA-DRB1; *Shared Epitope*; Suscetibilidade; Anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado (CCP)

## **Introdução**

---

Em Portugal existem, aproximadamente, 40.000 doentes com artrite reumatóide (AR). Nos últimos anos têm surgido inúmeros estudos direcionados à etiologia da doença, mas também dedicados à progressão clínica e radiológica e à terapêutica, essencialmente com o aparecimento dos chamados “agentes biológicos”.

Foi em 1859 que Alfred Garrod, um médico inglês, utilizou pela primeira vez o termo “artrite reumatóide”. Desde então, vários investigadores se têm debruçado sobre esta patologia, numa tentativa de perceber quais os mecanismos etiopatogénicos envolvidos.

Gilbert Alexander Bannatyne foi dos primeiros médicos a interessar-se pela doença, tendo escrito vários trabalhos sobre o tema. Em 1906, este médico escocês distinguiu os processos patológicos associados à AR daqueles que já eram conhecidos para outras doenças reumáticas, tais como a osteoartrite.

Na década de 60 do século XX, começaram a surgir vários estudos cujo objetivo era esclarecer a etiologia e a patogenia da AR. Desde essa altura até aos tempos atuais, várias conjecturas têm sido apontadas, no entanto, ainda não é possível estabelecer uma verdadeira relação causal ou ligação entre os diversos estudos.

Casos de AR eram detetados em famílias, facto que levou os cientistas a ponderarem um eventual envolvimento genético na etiologia da doença. A ligação da AR aos genes de histocompatibilidade (HLA-DRB1, nomeadamente HLA-DR4), primeiro referida por Stastny, em 1976, foi o primeiro passo no sentido de descobrir onde se situava e que papel desempenhava a componente genética no desenvolvimento da artrite reumatóide.

Mais tarde, em 1997, Silman e outros investigadores verificaram que a doença era mais frequente em gémeos monozigóticos do que em dizigóticos, realçando a importância dos fatores genéticos.



Rapidamente se chegou à conclusão que havia uma interação entre as moléculas HLA e os receptores dos linfócitos T, demonstrando que a ligação a determinados peptídeos antigénicos seria preponderante.

Este polimorfismo nos genes HLA-DRB1 revelou-se importante, vindo a ser designado de “*shared epitope*”, representando uma determinada sequência de aminoácidos presente nas transcrições moleculares dos genes referidos.

No que toca à existência de anticorpos específicos para esta doença, foi reconhecida a relevância dos anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado. Estes estão presentes em cerca de 70% dos doentes e são detectáveis antes do aparecimento da sintomatologia.

## **Métodos**

---

A presente revisão foi elaborada com base numa pesquisa bibliográfica realizada na Medline, em artigos disponíveis na Biblioteca Central dos Hospitais da Universidade de Coimbra e em livros de texto. A pesquisa foi feita para artigos em 4 idiomas (português, inglês, espanhol e francês). As palavras usadas para pesquisa dos artigos foram: *Rheumatoid Arthritis*; HLA-DRB1; *Shared Epitope*; *Anti-CCP Antibodies*.

Desta pesquisa foram escolhidos artigos que se relacionassem com a epidemiologia, etiologia e a patogenia da AR, com especial ênfase à componente genética da doença, nomeadamente a associação HLA-DRB1/suscetibilidade. Também foram selecionados artigos que abordavam temas como a produção de anticorpos anti-CCP e qual a influência dos alelos HLA-DRB1 na produção dos mesmos.

Dos artigos selecionados foram pesquisadas algumas referências que se enquadrassem no âmbito do trabalho a desenvolver.

## **Desenvolvimento**

---

### **1- Epidemiologia da Artrite Reumatóide**

Esta patologia tem uma prevalência mundial de cerca de 1%, afetando maioritariamente o sexo feminino numa proporção de 2:1, sendo esta diferença especialmente notória na fase reprodutiva. [Silva 2005]

A maior prevalência da doença no sexo feminino pode dever-se a efeitos estimulatórios dos estrogénios sobre o sistema imunitário.

A incidência anual de artrite reumatóide é cerca de 30 por cada 100000 pessoas, sendo a sua prevalência de cerca de 1% em Caucasianos, 0,1% em Africanos (meio rural) e cerca de 5% nos Índios Americanos (Chippewa, Pima e Blackfeet). [Peschken et al. 1999]

O seu pico de incidência situa-se entre os 35 e os 50 anos, é menos comum em idosos, no entanto, pode surgir em qualquer idade. [Silva 2005]

## 2- Etiologia – Que hipóteses existem? Quais os fatores de risco?

Não havendo uma causa especificamente definida, existem várias conjecturas que pretendem explicar o aparecimento da patologia.

Variados estudos têm sido efetuados analisando a influência de fatores como infecções, alterações hormonais, traumatismos, fatores ambientais (de entre os mais estudados, encontram-se o tabaco, o álcool e o consumo exagerado de café), entre outros.

Poucas bactérias foram reconhecidas como possíveis fatores incitantes na patogenia da AR. *Proteus mirabilis* foi das primeiras bactérias a ser identificada como suspeita [Deighton et al.1992] e, mais recentemente, *Phorphyromonas gingivalis* [Mikuls 2010].

Relativamente às infecções virais, alguns vírus têm sido associados à AR, é o caso, por exemplo do vírus Epstein-Barr (EBV). Em 2003, um estudo comprovou que os doentes com AR possuem uma maior carga viral de EBV do que as pessoas saudáveis. [Balandraud et al. 2003].

O vírus da rubéola foi apontado como possível agente etiológico, contudo, um estudo realizado em 1997 por Zhang et al., mostrou que este vírus não tem qualquer papel na etiopatogenia da AR.

Os retrovírus têm sido estudados nos últimos anos devido à sua capacidade de gerar uma inflamação crónica e uma sinovite proliferativa. Estes vírus conseguem ativar os monócitos sinoviais, induzir a produção de citocinas e, conseqüentemente, ativar a resposta inflamatória mediada pelos linfócitos T. Por exemplo, num estudo japonês, demonstrou-se que mulheres com AR tinham uma prevalência sérica 5 vezes superior de anticorpos anti-vírus T linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) que mulheres saudáveis. [Eguchi et al. 1996] Contudo, nenhum estudo foi capaz de provar que o HTLV-I é um agente causador desta doença, este

aparenta ser um fator predisponente, pelo que mais estudos deverão ser efetuados para clarificar esta questão.

O parvovírus B19 foi outro vírus que incitou a realização de vários estudos, contudo, até à data ainda não existem dados consensuais que permitam inferir acerca da contribuição deste no desenvolvimento da AR.

Os hábitos tabágicos são um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença.

Estudos realizados demonstraram que a exposição tabágica não só aumenta a suscetibilidade como também influencia a severidade da doença [Saag et al. 1997], visto que indivíduos com carga tabágica de pelo menos 25 U.M.A. (unidades maço-ano) eram mais suscetíveis de serem seropositivos, de terem erosões radiográficas e de terem nódulos reumatóides, quando comparados com indivíduos que nunca tinham fumado. [Wolfe 2000]

A cessação tabágica pode ajudar a prevenir o desenvolvimento da doença. Um estudo realizado nos Estados Unidos evidenciou que as mulheres que tivessem deixado de fumar há pelo menos 10 anos antes do início do estudo não partilhavam o elevado risco de desenvolvimento de AR, inerente às mulheres fumadoras. [Criswell et al. 2002]

O consumo de álcool também tem sido estudado no âmbito da AR. Em 2010, Maxwell et al. referiram que o consumo de álcool poderá ter um efeito protetor na patogenia da artrite reumatóide.

O consumo de café foi avaliado em vários estudos. Em 2003, Karlson et al efetuaram um estudo prospetivo numa população feminina, tendo concluído que não havia grande evidência de associação entre o consumo de café, descafeinado e chá e o risco de desenvolver a doença.

A importância da exposição ocupacional na AR tem sido alvo de investigações. [Khuder et al. 2002] Por exemplo, num estudo sueco, descobriu-se que a exposição à sílica aumentou o

risco de desenvolvimento de AR em homens suecos, independentemente dos hábitos tabágicos destes. [Stolt et al. 2005]

O género também tem sido apontado como um fator relevante, uma vez que a doença é 2 vezes mais frequente no sexo feminino. [Silva 2005]

Outros estudos comprovaram que mulheres multíparas têm menor probabilidade de desenvolver artrite reumatóide que mulheres nulíparas. Esta evidência constatou-se quando as mulheres tinham menos de 45 anos de idade, uma vez que acima dos 45 anos, não foram encontradas diferenças no diagnóstico de artrite reumatóide entre multíparas e nulíparas. Este estudo permitiu concluir que a gravidez funciona como um género de vacina que protege temporariamente contra a artrite reumatóide. [Guthrie et al. 2010]

O próprio aleitamento materno reduz o risco de desenvolvimento de artrite reumatóide. Segundo o estudo de Karlson et al. (2004), o aleitamento materno mantido durante pelo menos um ano reduz a incidência de artrite reumatóide.

É, ainda, incerto se as alterações a nível hormonal são o resultado da inflamação crónica ou se, de facto, níveis baixos de testosterona e elevados de estrogénio serão um factor de risco para o desenvolvimento desta patologia.

O sexo do doente também parece afectar o fenótipo, uma vez que os homens têm tendência a desenvolver a doença mais tarde, sendo, mais frequentemente, seropositivos para o fator reumatóide e para os anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado. [Jawaheer et al. 2006]

A associação dos contraceptivos orais à AR tem sido fonte de muita controvérsia. Pladevall-Vila et al., realizaram uma meta-análise de vários estudos controversos, contudo,

não conseguiram explicar que tipo de relação tem este fator com a etiopatogenia da doença.  
[Pladevall-Vila et al. 1996]

A hipótese genética tem sido alvo de bastantes estudos, não tendo sido identificado um agente causador mas sim a possibilidade da existência de determinados estímulos que, em indivíduos com predisposição genética, levem ao desencadear de uma resposta inflamatória. Caso o sistema imunitário não seja capaz de debelar a resposta inflamatória e mantendo-se a acção do estímulo desencadeante, a doença tornar-se-á crónica.

Em 2000, MacGregor et al. desenvolveram um estudo para determinar qual a contribuição genética na artrite reumatóide e chegaram à conclusão que esta tem uma cota parte de cerca 60%, sem diferenças significativas no que toca a género, idade, idade aquando do diagnóstico da doença e severidade da mesma.

A inflamação das articulações é mediada imunologicamente, contudo, a etiologia da doença não está claramente definida. A importância dos fatores genéticos, ambientais, hormonais, entre outros, não explica o que provoca o desencadear da inflamação crónica que caracteriza esta doença. É preciso achar um *trigger point* que explique concisamente o que acontece no organismo destes doentes. Os agentes infecciosos atrás referidos poderão ter o seu papel na fisiopatologia da doença, contudo, serão necessários novos estudos para clarificar a etiologia da AR.

### 3 - Patogenia da Artrite Reumatóide

Uma vez que não se sabe a etiologia precisa da AR, não é possível inferir com certeza acerca da sua patogenia.

A hipótese de que um agente ambiental poderia desencadear mecanismos auto-ímmunes é das mais consideradas (vários agentes possíveis foram já referidos), contudo, não existem, ainda, estudos que comprovem esta teoria. [Maini et al. 1995]

Outra hipótese avançada foi a de existir um processo de “mimetismo antigénico” em que um antigénio exterior ao organismo (semelhante a um antigénio *self*) estimula o sistema imunitário a reagir contra tecidos *self*. Também esta teoria não foi, ainda, confirmada em estudos, apesar de ser das que mais foi avaliada nos últimos anos. [Maini et al. 1995]

Tal como já foi referido, a componente genética da AR também parece desempenhar um papel no desenvolvimento da doença. Segundo esta teoria, a produção de citocinas desencadeada pela resposta imunitária a agentes extrínsecos levaria a um aumento da capacidade de apresentação antigénica. Deste modo, auto-antigénios que passariam “despercebidos”, são reconhecidos por linfócitos T auto-reactivos, devido à expressão genética aumentada (nomeadamente moléculas HLA classe II). [Maini et al. 1995]

A presença dos antigénios ambientais, bem como de antigénios específicos da cartilagem e dos condrócitos, poderá ser a razão da existência de respostas imunitárias nas articulações sinoviais. [Maini et al. 1995]

O aumento da celularidade e da angiogénese são característicos da doença nas membranas sinoviais. O aumento do número de vasos permite um maior recrutamento de células, nomeadamente linfócitos T. [Maini et al. 1995]



Os linfócitos T desempenham um papel fundamental na patogenia da AR, tanto na iniciação da doença, como na sua perpetuação. Cerca de 20 a 50% das células presentes nas membranas sinoviais de doentes com AR são linfócitos T. [Maini et al. 1995]

Estes linfócitos T, presentes nas membranas sinoviais, expressam um marcador que se correlaciona com a atividade da doença, o CD69 (marcador de ativação precoce). Além disso, expressam o ligando do CD40 (CD 154) que influencia a proliferação de linfócitos B e consequente produção de anticorpos. Este ligando do CD40 é membro da superfamília de recetores do fator de necrose tumoral (TNF). [Steiner 2009]

Apesar de os linfócitos B não existirem em grande número nas membranas sinoviais, há uma grande quantidade de plasmócitos nestes tecidos, que produzem auto-anticorpos contra o colagénio e, também, fator reumatóide. Certos estudos revelaram que, isoladamente, o fator reumatóide incita a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos, particularmente, a interleucina 1 (IL-1) e o  $TNF\alpha$ , contribuindo, assim para a perpetuação da inflamação. [Maini et al. 1995]

Para além das células apresentadoras de antígenos (macrófagos, linfócitos B e células dendríticas), também os condrócitos são apontados como possíveis células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T. Esta hipótese foi levantada, uma vez que os condrócitos expressam moléculas HLA classe II, *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) e secretam citocinas, processos estes que facultam a apresentação de antígenos aos linfócitos T. [Maini et al. 1995]

Várias são as citocinas implicadas na cascata inflamatória da AR, contudo, o papel principal poderá ser desempenhado pelo interferão  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), que se revelou fundamental na ativação de macrófagos e na indução da expressão de moléculas HLA classe II. [Maini et al. 1995]

O fator estimulador de colônias granulócito-monócito (GM-CSF) é responsável pelo aumento da expressão de moléculas HLA-DR nos monócitos. Contudo, os anticorpos que revelaram uma maior inibição da expressão HLA não foram anti-IFN $\gamma$ , nem anti-GM-CSF, mas sim anti-TNF $\alpha$ . Uma vez que o TNF $\alpha$  não atua diretamente sobre a expressão das moléculas referidas, ainda não foi possível compreender claramente o porquê dos resultados obtidos. O TNF $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que atua na indução de moléculas de adesão, tais como o ICAM-1. [Maini et al. 1995]

O TNF $\alpha$  encontra-se, também, envolvido no processo de angiogênese, já referido, que ocorre nas membranas sinoviais. Neste processo está também envolvida a IL-1, bem como outros fatores. Apesar de ter sido descrito, ainda não se descobriu exatamente, qual o papel da angiogênese na doença. [Maini et al. 1995]

A importância do TNF $\alpha$  na fisiopatologia desta doença é demonstrada através do desenvolvimento de terapêuticas que bloqueiem esta citocina, nomeadamente com o aparecimento de anticorpos quiméricos contra este fator.

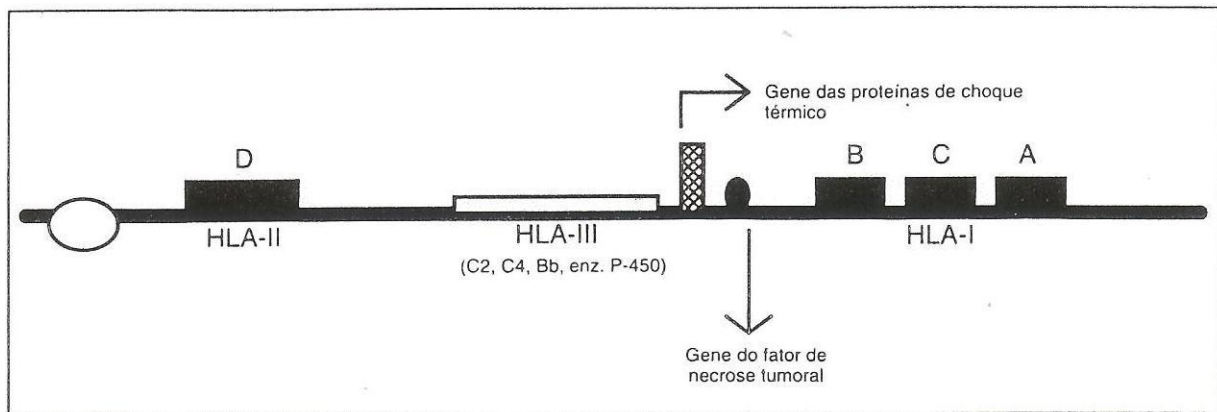
A patogênese da AR continua a necessitar de árdua pesquisa. Atualmente, uma das medidas de investigação adotadas assente nas experiências terapêuticas, cujos resultados poderão elucidar alguns aspetos etiopatogénicos.

#### 4 – Noções de Fisiopatologia

O complexo major de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex - MHC), existente em todos os animais vertebrados, é conhecido como HLA nos seres humanos e situa-se no braço curto do cromossoma 6. Neste locus, localizam-se diversos genes com importantes funções imunológicas, que são fundamentais na resposta imune aos antígenos. [Skare 1999]

O MHC foi descoberto em 1937 por Peter Gorer, enquanto realizava um estudo de transplante em ratos. Veio-se a descobrir que as moléculas do MHC mediavam a interação entre leucócitos, determinando a compatibilidade de doadores de órgãos para transplante, a rejeição a tecidos transplantados e a suscetibilidade a doenças auto-imunes.

Atualmente, sabe-se que o MHC engloba 3 classes (figuras 1 e 2).



**Figura 1** – Braço curto do cromossoma 6 [Skare 1999]

## Human HLA complex

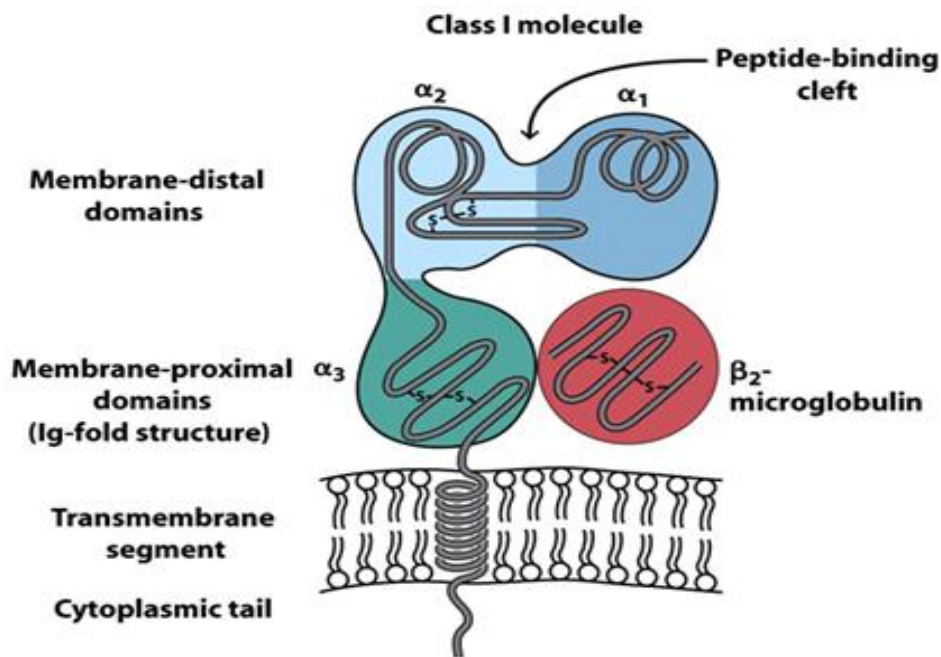
Complex	HLA							
MHC class	II			III		I		
Region	DP	DQ	DR	C4, C2, BF		B	C	A
Gene products	DP $\alpha\beta$	DQ $\alpha\beta$	DR $\alpha\beta$	C' proteins	TNF- $\alpha$ TNF- $\beta$	HLA-B	HLA-C	HLA-A

**Figura 2** – Diferentes classes de MHC nos humanos [Goldsby et al. 2003]

As moléculas de classe I (correspondentes às moléculas HLA-A, B e C) apresentam peptídeos derivados de proteínas endógenas intracelulares que são digeridas no citosol [Kindt et al. 2007] (por exemplo proteínas de origem viral [Skare 1999]. O complexo é, depois, inserido na membrana citoplasmática, estando o peptídeo ligado à parte extracelular da molécula MHC. [Kindt et al. 2007]

As moléculas MHC classe I são expressas em praticamente todas as células do organismo, desde que estas sejam nucleadas [Kindt et al. 2007], pelo que se excluem, por exemplo, os eritrócitos e os trofoblastos. Estas moléculas apresentam peptídeos aos linfócitos T citotóxicos. [Kindt et al. 2007]

Estas moléculas são constituídas por uma longa cadeia  $\alpha$  e pela  $\beta_2$ microglobulina (codificada pelo cromossoma 15 – não fazendo parte do MHC) (**Figura 3**). [Kindt et al. 2007]



**Figura 3** – Molécula MHC classe I [Goldsby et al. 2003]

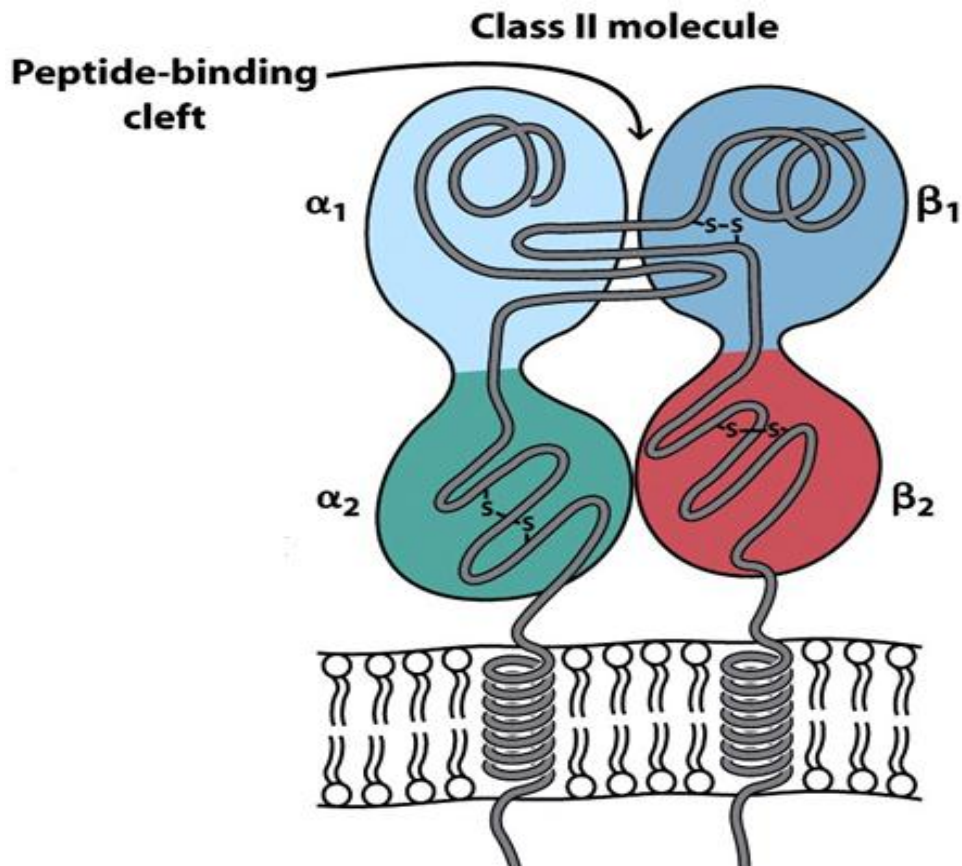
A cadeia  $\alpha$  do MHC classe I apresenta três domínios,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , como representado na figura 4. [Kindt et al. 2007] O peptídeo a ser apresentado liga-se à região central entre os domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . [Kindt et al. 2007]

Os genes MHC classe II (DR, DQ e DP) codificam glicoproteínas que são expressas à superfície de células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (**Quadro 1**).

<b>Professional antigen-presenting cells</b>	<b>Nonprofessional antigen-presenting cells</b>	
<b>Dendritic cells (several types)</b>	<b>Fibroblasts (skin)</b>	<b>Thymic epithelial cells</b>
<b>Macrophages</b>	<b>Glial cells (brain)</b>	<b>Thyroid epithelial cells</b>
<b>B cells</b>	<b>Pancreatic beta cells</b>	<b>Vascular endothelial cells</b>

**Quadro 1** – Células apresentadoras de antígenos [Goldsby et al. 2003]

Estas moléculas são constituídas por uma cadeia pesada  $\alpha$  (dois sub-domínios –  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) e uma cadeia leve  $\beta$  (dois sub-domínios –  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ), sendo ambas codificadas pelos genes MHC, contrariamente às moléculas MHC de classe I. A **figura 5** ilustra uma molécula MHC classe II. [Kindt et al. 2007]

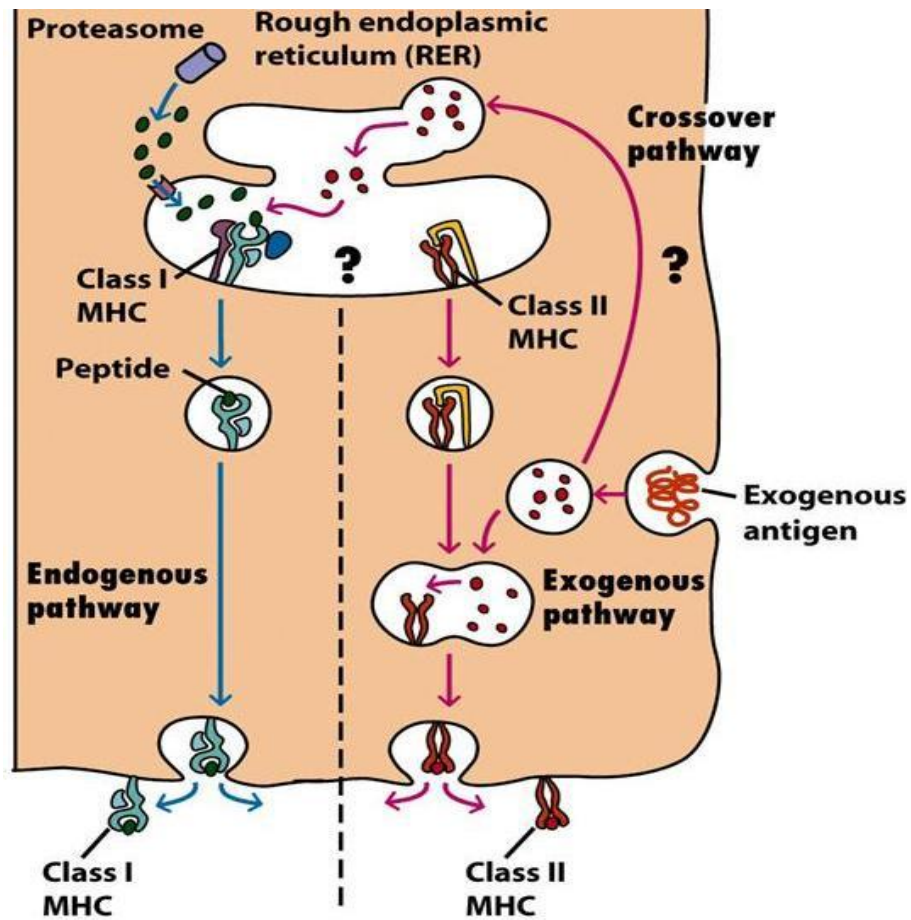


**Figura 5** – MHC classe II [Goldsby et al. 2003]

Os antígenos que penetram no organismo são sujeitos a um processamento antigénico pelas células apresentadoras de antígenos, podendo este ocorrer por fagocitose ou endocitose. [Kindt et al. 2007]

A função destas moléculas de MHC é apresentar antígenos às células T helper (CD4). [Kindt et al. 2007].

A **figura 6** ilustra, sinteticamente, os processos de formação dos peptídeos apresentados pelas moléculas MHC classe I (via endógena) e II (via exógena).



**Figura 6** – Vias de apresentação dos antígenos (endógenos e exógenos) [Goldsby et al. 2003]

Os genes MHC classe III são estruturalmente diferentes dos das classes I e II. Estes codificam proteínas que não estão relacionadas com o processamento e apresentação de antígenos. Incluem-se citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$ , vários componentes do complemento e proteínas de choque térmico. [Kindt et al. 2007]

Inúmeras doenças têm sido associadas com os genes HLA, de entre elas, a artrite reumatóide. Como já referido, já desde 1976 que se descobriu a associação entre esta patologia e as moléculas MHC classe II, nomeadamente o locus HLA-DRB1.



## 5 - O componente genético

Como já referido, pensa-se que haja diferentes estímulos que, quando em contacto com indivíduos com predisposição genética no sistema imunitário, possam despoletar uma reação inflamatória.

Embora pouco definida, existem estudos que suportam a componente genética, evidenciando a concordância da doença em gémeos monozigóticos (15,4%) quando comparada com gémeos dizigóticos (3,6%) [Silman et al. 1993].

A hipótese genética é apoiada pelo aumento do risco de AR entre os parentes de doentes com a doença referenciados em hospitais, contudo, uma provável transmissão mendeliana nunca foi provada, pensando-se que a doença não será transmitida pelos padrões mendelianos. Em alguns doentes existe uma importante história familiar da doença enquanto noutros observam-se apenas casos esporádicos.

De entre os vários fatores genéticos que foram associados à AR, as moléculas de HLA foram as que mostraram maior evidência científica, tendo-se verificado que estas contribuíam em cerca de 37% para a componente genética desta patologia. [Deighton et al. 1989]

Estudos recentes permitiram identificar as regiões cromossómicas que estão, potencialmente, associadas à artrite reumatóide. O antigénio leucocitário humano (HLA)-DRB1 (HLA classe II) foi um dos loci identificados, situando-se no cromossoma 6 (6p21.3).

A ligação entre a artrite reumatóide e o HLA classe II foi descoberta há 35 anos. [Statsny et al. 1976]. Desde então, vários alelos foram associados a esta patologia, nomeadamente: HLA-DRB1\*0101, \*0102, \*0401, \*0404, \*0405, \*0408, \*1001 e \*1402. [Gregersen et al. 1987]

Estudos demonstraram que os vários alelos atrás referidos possuíam em comum uma sequência de aminoácidos na terceira região hipervariável da cadeia DRB1, tendo-se denominado esta sequência de *shared epitope* (SE). [Gregersen et al. 1987]

Esta sucessão de aminoácidos situa-se nas posições 70 a 74 da molécula, diferindo na combinação de aminoácidos apresentada. [Gregersen et al. 1987] Por exemplo, a sequência pode ser QKRAA, QRRRA, RRRRA ou até DERRA. [Gregersen et al. 1987] A seguinte tabela explicita quais os aminoácidos existentes em cada posição para cada um dos alelos HLA-DRB1 anteriormente referidos. (**Quadro 2**)

HLA-DRB1* Allele	Amino Acid Position				
	70	71	72	73	74
*0101	Q	R	R	A	A
*0102	Q	R	R	A	A
*0401	Q	K	R	A	A
*0404	Q	R	R	A	A
*0405	Q	R	R	A	A
*0408	Q	R	R	A	A
*1001	R	R	R	A	A
*1402	Q	R	R	A	A

**Quadro 2** – Aminoácidos codificados pela terceira região hipervariável dos alelos associados à AR (adaptado de [Gonzalez-Gay et al. 2002])

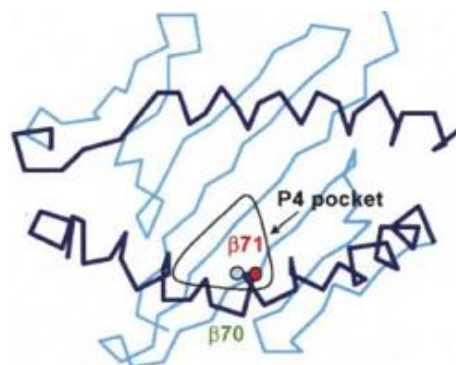
As letras atribuídas a cada aminoácido representam (**Quadro 3**):

Letra	Aminoácido
<b>A</b>	Alanina
<b>D</b>	Ácido Aspártico
<b>E</b>	Ácido Glutâmico
<b>K</b>	Lisina
<b>Q</b>	Glutamina

<b>R</b>	Arginina
----------	----------

**Quadro 3** – Aminoácidos presentes nos vários alelos de HLA-DRB1 (adaptado de [du Montcel et al. 2005])

As características dos aminoácidos presentes da sequência 13, 70, 71, 74 e 78 determinam a conformação do sítio de ligação dos peptídeos nas moléculas de HLA-DRB1, nomeadamente a estrutura *P4 Pocket*, definindo se esta possui uma carga positiva ou negativa. Vários estudos mostraram que estas alterações no *P4 Pocket* têm consequências na variedade de peptídeos que são apresentados por estas moléculas. A localização do *P4 Pocket* na molécula de HLA-DRB1 (sítio de ligação aos peptídeos) encontra-se na **figura 8**. [Wucherpfenning 2006]



**Figura 8** – Molécula de HLA-DRB1, mostrando os resíduos  $\beta 70$  e  $\beta 71$ , fundamentais na determinação da forma e da carga do *P4 Pocket* (adaptado de Immunogenetics of autoimmune diseases, chapter 1 – pág 2)

Os alelos já referidos, que possuem o *shared epitope* contêm um *P4 Pocket* com carga positiva. [Reviron et al. 2001]

A importância da carga do *P4 Pocket* na zona de ligação ao peptídeo foi frisada por Matthey et al., tendo estes indicado que esta seria determinante na suscetibilidade à AR. [Matthey et al. 2001]

## 6 - Suscetibilidade/Proteção

Em 2001, Matthey et al. estudaram a influência do aminoácido na posição 70 da sequência de aminoácidos da terceira região hipervariável da cadeia DRB1 da molécula de HLA-DRB1 na associação entre a AR e os alelos HLA-DRB1 numa população do Reino Unido e numa população espanhola.

Inicialmente, os genótipos dos doentes e dos controlos foram classificados como SE+/SE+, SE+/SE- e SE-/SE-, sendo a sigla SE - *shared epitope*. Em ambas as populações, a associação entre SE+/SE+ e a doença foi estatisticamente significativa, como evidencia a **tabela 1**.

**Tabela 1** – Resultados da comparação entre doentes e controlos com SE+/SE+ (adaptado de [Matthey et al. 2001])

SE+/SE+	População Reino Unido	População Espanha
Odds-Ratio (OR)	7,29	4,29
Significância Estatística	$p_c < 0,0001$	$p_c < 0,0006$

Pelo contrário, a associação entre a doença e o genótipo SE-/SE- foi menos evidente em ambos os grupos estudados (Reino Unido – OR 0,19 e  $p < 0,0001$ ; Espanha OR 0,30 e  $p < 0,0001$ ).

Quando testaram a influência do aminoácido glutamina (Q) e do aminoácido ácido aspártico (D) na posição 70, notaram que, em ambas as populações, indivíduos SE+/SE+ (Q<sup>70SE+</sup>/Q<sup>70SE+</sup>) apresentavam um maior risco de desenvolver AR. Nos indivíduos SE+/SE-, aqueles cujo genótipo era Q<sup>70SE+</sup>/Q<sup>70SE-</sup> apresentavam um maior risco do que os Q<sup>70SE+</sup>/D<sup>70SE-</sup>. Por último, os indivíduos com genótipo D<sup>70SE-</sup>/D<sup>70SE-</sup> foram os que apresentaram menor risco de desenvolver a doença. Os resultados obtidos encontram-se na **tabela 2**.

**Tabela 2** – Comparação, entre doentes com AR e controlos, das frequências dos genótipos SE e não-SE, consoante o aminoácido na posição 70 da cadeia DRB1 [Mattey et al. 2001]

UK Population Genotype Designation	RA, n (%)	Control, n (%)	OR (95% CI)	P <sub>c</sub>
Q <sup>70SE+</sup> /Q <sup>70SE+</sup>	162 (34.0)	11 (6.1)	7.93 (4.06–15.9)	< 0.0001
Q <sup>70SE+</sup> /Q <sup>70SE-</sup>	117 (24.6)	26 (14.4)	1.96 (1.20–3.22)	0.012
Q <sup>70SE+</sup> /D <sup>70SE-</sup>	90 (18.9)	36 (20.0)	0.93 (0.59–1.47)	0.75
Q <sup>70SE-</sup> /Q <sup>70SE-</sup>	23 (4.8)	24 (13.3)	0.33 (0.17–0.63)	0.0005
Q <sup>70SE-</sup> /D <sup>70SE-</sup>	35 (7.4)	43 (23.9)	0.25 (0.15–0.42)	< 0.0001
D <sup>70SE-</sup> /D <sup>70SE-</sup>	17 (3.6)	25 (13.9)	0.23 (0.12–0.46)	< 0.0001
*Other genotypes	32 (6.7)	15 (8.3)		
<b>Spanish Population</b>				
Q <sup>70SE+</sup> /Q <sup>70SE+</sup>	30 (16.7)	6 (4.1)	4.66 (1.78–12.91)	0.0016
Q <sup>70SE+</sup> /Q <sup>70SE-</sup>	37 (20.7)	11 (7.6)	3.17 (1.49–6.91)	0.004
Q <sup>70SE+</sup> /D <sup>70SE-</sup>	41 (22.9)	27 (18.6)	1.30 (0.73–2.32)	0.69
Q <sup>70SE-</sup> /Q <sup>70SE-</sup>	10 (5.6)	9 (6.2)	0.89 (0.32–2.47)	0.81
Q <sup>70SE-</sup> /D <sup>70SE-</sup>	24 (13.4)	32 (22.1)	0.55 (0.29–1.02)	0.12
D <sup>70SE-</sup> /D <sup>70SE-</sup>	20 (11.2)	39 (26.9)	0.34 (0.18–0.59)	0.0016
*Other genotypes	17 (9.5)	21 (14.5)		

\*Other genotypes: any genotype containing R<sup>70SE+</sup> or R<sup>70SE-</sup> (e.g., Q<sup>70SE+</sup>/R<sup>70SE+</sup>, R<sup>70SE+</sup>/R<sup>70SE+</sup>, Q<sup>70SE+</sup>/R<sup>70SE-</sup>, Q<sup>70SE-</sup>/R<sup>70SE-</sup>, etc.).

Reviron et al. realizaram um estudo em 2001, cujo objetivo era determinar qual a influência dos alelos HLA-DRB1 não-SE no desenvolvimento de AR em 3 populações francesas, visto que a associação entre os alelos HLA-DRB1 SE e a AR em populações francesas já havia sido previamente confirmada. [Toussiro et al. 1999] Assim, após definir o genótipo dos doentes (alelos HLA-DRB1), os alelos foram classificados em SE (presentes no grupo referido anteriormente como alelos *shared epitope*) e não-SE (Xp4), consoante a carga do P4 *Pocket*, como é explícito na **figura 9**.

DRB1*																					
																		0801	1301		
																		0802	1101	1302	
0404				0301				0403	1501				0803	1104	1304						
0405				0101				0302	0406	1502				0804	1106	1102					
0401	0408	1001	0102	1402	1109	0407	0901	1401	1503	1601	0701	0805	1305	1201	1303	1309	0402	0103	1103		
$\beta$ -chain position																					
13	H	H	F	F	S	S	H	F	S	R	R	Y	G	S	G	S	S	H	F	S	
70	Q	Q	R	Q	Q	Q	Q	R	R	Q	D	D	D	D	D	D	Q	D	D	D	
71	K	R	R	R	R	K	R	R	R	A	R	R	R	R	R	K	A	E	E	E	
74	A	A	A	A	A	R	E	E	E	A	A	Q	L	A	A	A	A	A	A	A	
78	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	V	Y	Y	Y	V	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
Electric charge	++	++	++	+	+	++	+	+	+	+	+	N	N	N	N	N	N	-	--	--	
Type	SE	SE	SE	SE	SE	XP4p	XP4p	XP4p	XP4p	XP4p	XP4p	XP4n	XP4n	XP4n	XP4n	XP4n	XP4n	XP4n	XP4n	XP4n	

\* Two kinds of DRB1\*X alleles are distinguished according to the electric charge in their P4 pocket: DRB1\*X P4 positive (XP4p) and DRB1\*X P4 neutral or negative (XP4n). N = neutral; SE = shared epitope.

**Figura 9** – Resíduos polimórficos do P4 Pocket na cadeia DRB1 da molécula de HLA-DRB1 (adaptado de [Reviron et al. 2001])

Os alelos não-SE foram então classificados como XP4p quando a carga eléctrica do P4 *Pocket* fosse positiva e XP4n quando esta fosse negativa ou neutra. Deste modo, obtiveram-se 6 tipos de genótipos (**Quadro 4**):

Genótipos Possíveis
SE/SE
SE/XP4p
SE/XP4n
XP4p/XP4p
XP4p/XP4n
XP4n/XP4n

**Quadro 4** – Genótipos dos alelos HLA-DRB1 (adaptado de [Reviron et al. 2001])

Os resultados obtidos permitiram concluir que nas 3 populações estudadas, a associação HLA-DRB1 e AR é de 80%, sendo que os alelos variam consoante a região estudada.

Dividindo os alelos em 3 grupos, os resultados obtidos estão expressos na **tabela 3**.

**Tabela 3** – Associação entre os diferentes alelos HLA-DRB1 e a AR – Risco Relativo (adaptado de [Reviron et al. 2001])

Alelos	Risco Relativo	Associação com AR
SE/SE SE/XP4p	4	Suscetibilidade/Predisposição
SE/XP4n XP4p/XP4p	1	Neutra
XP4p/XP4n XP4n/XP4n	0.25	Proteção

Assim, Reviron et al. concluíram que os alelos HLA-DRB1 não-SE que possuem um P4 *Pocket* de carga negativa ou neutra, conferem proteção para a AR, enquanto que os alelos SE (P4 *Pocket* com carga positiva) se associam a um maior risco de vir a desenvolver AR.

Neste artigo, os autores levantaram a questão de como seria possível um alelo HLA-DRB1 com P4 *Pocket* de carga negativa ou neutra conferir proteção para a AR. A resposta apresentada indica que os alelos XP4n (carga negativa ou neutra) têm a capacidade de se associar a certos peptídeos que os SE ou XP4p não possuem. Isto porque peptídeos que possuam cadeias laterais com carga positiva poderão apenas ligar-se a moléculas cujo P4 *Pocket* seja de carga neutra ou negativa. Assim, os autores sugerem que tal pode acontecer na periferia ou no timo, permitindo aos linfócitos T CD4 reconhecer determinados peptídeos (de carga positiva) ligados às moléculas MHC classe II (HLA-DRB1), levando a uma seleção que poderá ser a causa protetora contra a AR.

Num estudo de coorte realizado em 2002, Fries et al. verificaram que, comparando pacientes caucasianos com AR e controlos, no que toca à existência de alelos SE em cada um destes, em 66% dos casos, os pacientes tinham pelo menos uma cópia de um alelo SE, enquanto que nos controlos, tal acontecia em 45% dos casos. Dentro dos pacientes, aqueles que eram seropositivos para factor reumatóide (FR) tinham pelo menos 1 cópia em 73% dos casos. A frequência dos genótipos, de acordo com o número de cópias de alelos SE nos indivíduos estudados encontra-se na **tabela 4**.

**Tabela 4** – Frequência dos genótipos em pacientes caucasianos com AR e controlos, de acordo com o número de cópias dos alelos SE [Fries et al. 2002]

No. of copies	All RA (n = 793)	Seropositive RA (n = 528)†	Seronegative RA (n = 249)†	Controls (n = 791)
None	34	27	51	55
1 or 2	66	73	49	45
1	49	52	42	38
2	17	21	8	7

\* Values are percents.

† For 16 patients, information on rheumatoid factor status was not available.

Também no estudo de Fries et al., os autores concluíram que, dos vários genótipos presentes, entre aqueles que possuíam apenas uma cópia de um alelo SE, o alelo \*0401 destacou-se por se encontrar o dobro da sua frequência nos pacientes seropositivos, em relação aos doentes seronegativos e aos controlos, denotando que este atuará como gene “dominante” no que toca à suscetibilidade à doença.

Os autores referidos concluíram, também, que, ao contrário do alelo \*0401, o alelo \*0404 e os genótipos \*10 necessitavam de duas cópias (homozigotia) para aumentar a suscetibilidade à doença, podendo concluir-se que estes atuaram como genes “recessivos”. Em pacientes seropositivos, quando comparados os genótipos \*0401/X (outros alelos SE,



podendo ser outra cópia de \*0401) e \*0401/\*0404, os valores de *odds ratio* obtidos foram, respetivamente, 1.8 e 9.6 no grupo do sexo masculino e 2.1 e 3.2 no grupo do sexo feminino, confirmando-se a “dominância” do alelo \*0401.

Uma vez que estes resultados foram obtidos em pacientes seropositivos, os autores referiram que a associação entre os genótipos SE e a AR seronegativa é um assunto controverso, uma vez que não existem estudos que evidenciem uma relação entre ambos.

Gilbert et al. (2003) publicaram um estudo, indicando que os alelos HLA-DRB1 podiam ser classificados como exercendo efeitos de suscetibilidade à doença, proteção ou mesmo efeitos neutros. A população estudada era oriunda do Sul de França.

A classificação usada por estes autores na elaboração do artigo encontra-se explicitada no quadro seguinte. (**Quadro 5**)

RSPs	Sequence (AA: 70,71,74)	HLA DRB1* alleles (observed in the study)
RSP « A » <sup>a</sup>	Q or R / R or K / A	DRB1*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *1001, *1402
RSP « R »	Q / K / R	DRB1 *0301, *0302
RSP « E »	Q or R / R / E	DRB1 *0403, *0406, *0407, *0901, *1401
RSP « Q »	DRQ	DRB1 *0701
RSP « Dr »	D / R or K / A or L	DRB1 *08, *1101, *1104, *1105, *1106, *12, *1303, *16
RSP « a »	QAA	DRB1 *1501, *1502
RSP « De »	DEA	DRB1 *0103, *0402, *1102, *1103, *1301, *1302, *1304

<sup>a</sup> RSP “A” corresponds to “shared epitope” HLA-DRB1 alleles

Abbreviations: HLA = human leukocyte antigen; RSP = restrictive super type pattern.

**Quadro 5** – Classificação dos alelos HLA-DRB1 consoante os aminoácidos presentes nas posições 70, 71 e 74 do P4 *Pocket* [Ou et al., citado por Gilbert et al.]

Os resultados obtidos evidenciam que os alelos “A” estão significativamente associados à doença (esta é a categoria que contém os alelos SE). Os alelos “Q” e “De” foram os menos frequentemente observados nos indivíduos da amostra, no entanto, foi possível concluir que estes exercem um efeito protetor para a AR. Quanto aos alelos “Dr”, apesar de estes terem sido encontrados em maior número em controlos, indicando uma possível tendência para a

proteção, os resultados não foram estatisticamente significativos. Por último, os resultados obtidos para os alelos “a”, “E” e “R” não foram diferentes entre os pacientes e os controles, pelo que se concluiu que estes exercem um efeito neutro. A **tabela 5** apresenta os dados referidos.

**Tabela 5** – Frequência dos alelos HLA-DRB1 segundo a classificação apresentada no quadro 2 [Gilbert et al. 2003]

DRB1/ DRB1	RA patient alleles (n = 400)		Controls alleles (n = 400)		OR	95% CI	p Value	p <sub>c</sub> Value
	Number	Percent	Number	Percent				
RSP « A »	192	48.0	70	17.5	4.35	3.11–6.10	<0.01	<0.01
RSP « R »	39	9.75	50	12.5	0.76	0.47–1.21	0.22	
RSP « E »	21	5.25	29	7.25	0.71	0.38–1.31	0.31	
RSP « Q »	26	6.5	59	14.75	0.40	0.24–0.67	<0.01	<0.01
RSP « Dr »	60	15.0	82	20.5	0.68	0.47–1.00	<0.05	
RSP « a »	34	8.5	36	9.0	0.94	0.56–1.58	0.90	
RSP « De »	28	7.0	74	18.5	0.33	0.20–0.54	<0.01	<0.01

Quando compararam a frequência dos diferentes genótipos e a sua associação com a AR, Gilbert et al. verificaram que os genótipos A/A eram os que mais significativamente se associavam à doença, sendo o OR de 6.68 e o  $p_c < 0.01$ . Nos genótipos A/X (quaisquer alelos excepto outra cópia A), nem todos se associaram à doença, como por exemplo os genótipos A/De (OR 1.7,  $p_c$  não estatisticamente significativo) e A/Q (OR 1.32,  $p_c$  não estatisticamente significativo). Dos genótipos X/X (sem alelos “A”), aqueles que possuíam pelo menos um alelo “De” ou “Q” obtiveram um OR de 0.14 e um valor  $p_c < 0.01$ , mais uma vez provando que os dois alelos referidos exercem um efeito protector na patogenia desta doença.

Ruiz-Morales et al. (2004) realizaram um estudo que abordava a influência dos alelos HLA-DRB1 na suscetibilidade para o desenvolvimento de AR e também os efeitos protetores do aminoácido ácido aspártico na posição 70 da cadeia DRB1 da molécula HLA-DRB1 numa população de mestiços mexicanos.

Após terem identificados os alelos HLA-DRB1 que continham a sequência SE, os autores verificaram que a associação entre estes e a doença era estatisticamente significativa (OR 3.3 e  $p_c < 0.003$ ). Os alelos DRB1 que mais frequentemente continham sequências SE foram \*0404, \*0405 e \*0101. A **tabela 6** demonstra os resultados obtidos.

**Tabela 6** – Valores da frequência genética dos alelos \*0404, \*0405 e \*0101 (comparação entre os pacientes com AR e controlos) [Ruiz-Morales et al. 2004]

Alelos	Pacientes com AR	Controlos
*0404	0.161	0.045
*0405	0.065	0.010
*0101	0.065	0.035

No que toca à influência do aminoácido ácido aspártico ( $D^{70+}$ ) na posição 70 da cadeia  $\beta$  do gene DRB1, apesar de este não ser frequente na população de indivíduos estudados, os autores concluíram que este possui efeitos protetores, uma vez que os alelos que o possuem (neste caso, foram estudados: \*07, \*11 e \*08) existem em maior número no grupo dos controlos (OR 0.4,  $p_c < 0.003$ ). Além disso, o número de indivíduos que possuem, pelo menos, uma cópia de um alelo DRB1 com  $D^{70+}$  é também maior no grupo dos controlos (OR 0.4,  $p_c < 0.004$ ). Por último, também a frequência dos genótipos com duas cópias com  $D^{70+}$  foi superior no grupo dos controlos (OR 0.19,  $p_c < 0.01$ ).

Os autores van der Helm-van Mil et al. (2005) fizeram uma investigação prospetiva com o objetivo de avaliar o efeito dos alelos DRB1 com a sequência DERAA na suscetibilidade e severidade da AR e também para distinguir os efeitos não-predisposicionais e os protetores

em relação a esta patologia. O **quadro 6** compreende quais os alelos SE, DERA A e X considerados.

<b>SE</b>	HLA-DRB1 *0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *1001, *1402
<b>DERAA</b>	HLA-DRB1 *0103, *0402, *1102, *1103, *1301, *1302, *1304
<b>X</b>	Outros alelos HLA-DRB1

**Quadro 6** – Alelos HLA-DRB1 SE, DERA A e X considerados no estudo (adaptado de [van der Helm-van Mil et al. 2005])

Os indivíduos da amostra foram divididos em 6 grupos consoante o genótipo que apresentavam. Em seguida, foram calculadas as frequências dos genótipos em indivíduos com AR e em controlos. Por fim, calcularam-se os *odds ratio* e as significâncias estatísticas. Os resultados obtidos são apresentados nas **tabelas 7 e 8**.

**Tabela 7** – Frequência dos genótipos de HLA-DRB1 em doentes com AR e em controlos. (adaptado de [van der Helm-van Mil et al. 2005])

Group	DRB1 genotype†	RA patients (n = 440)	Controls (n = 423)
A	SE/SE	70 (15.9)	26 (6.1)
B	SE/X	187 (42.5)	124 (29.3)
C	SE/DERAA	27 (6.1)	29 (6.9)
D	X/X	112 (25.5)	149 (35.2)
E	X/DERAA	36 (8.2)	87 (20.6)
F	DERAA/DERAA	8 (1.8)	8 (1.9)

**Tabela 8** – Valores de *odds ratio* e significância estatística na comparação entre os grupos estudados (adaptado de [van der Helm-van Mil et al. 2005])

	<b>OR</b>	<b>P</b>
<b>Grupo B vs. Grupo C</b>	0.6	0.1
<b>Grupo D vs. Grupo E+Grupo F</b>	0.6	0.03
<b>Grupo A+Grupo B vs. Grupo D</b>	2.3	<0.01

Comparando o grupo B com o C, verifica-se que, embora o resultado obtido não seja estatisticamente significativo, apesar da presença de um alelo SE, o alelo DERAA diminui o risco de desenvolver AR.

Relacionando os grupos A+B com o grupo C, os autores averiguaram que os primeiros se associavam a um maior risco de desenvolver a doença quando comparados com o grupo C onde não havia alelos SE.

Na comparação entre os grupos D e E+F, o resultado obtido foi estatisticamente significativo, demonstrando que a sequência de aminoácidos DERAA induz um menor risco de desenvolver a doença.

Tanto nos pacientes com alelos SE, como naqueles em que estes não estão presentes, a existência de um alelo com a sequência DERAA mostrou sempre um menor risco no que toca ao desenvolvimento da AR (OR 0.5 e P 0.03 nos primeiros e OR 0.6 e P 0.03 nos segundos). Assim, os autores concluíram que a sequência DERAA confere, de facto, uma diminuição do

risco de desenvolver a doença, sendo que tal não acontece apenas quando está presente um alelo SE.

du Montcel et al. (2005) propuseram uma nova classificação dos HLA-DRB1, baseada na sequência de aminoácidos nas posições 70 a 74 da cadeia DRB1 e testaram a sua associação à suscetibilidade de desenvolver a doença. Este estudo propôs realizar uma reconsideração da hipótese de os alelos SE estarem relacionados com a suscetibilidade para a AR.

A nova classificação proposta é exemplificada no **quadro 7**.

Sequência RAA presente, diferindo o aminoácido na posição 71	Sequência RAA ausente
<b>S<sub>1</sub> – ARAA, ERAA</b>	<b>X</b>
<b>S<sub>2</sub> – KRAA</b>	
<b>S<sub>3</sub> – RRAA → S<sub>3D</sub> – DRRRA → S<sub>3P</sub> – QRRAA/RRRAA (diferindo o aminoácido na posição 70)</b>	

**Quadro 7** - Nova classificação dos alelos HLA-DRB1 segundo du Montcel et al. 2005

Na população estudada (doentes franceses caucasianos com AR), as frequências dos novos alelos foram as seguintes (**Tabela 9**):

**Tabela 9** – Frequência dos alelos HLA-DRB1 segundo a classificação de [du Montcel et al. 2005]

Alelos	Frequência
S <sub>1</sub>	24%
S <sub>2</sub>	9%
S <sub>3D</sub>	10%
S <sub>3P</sub>	21%
X	36%

Quando os autores compararam os alelos no que concerne à suscetibilidade para a AR, verificaram que não existiam diferenças significativas entre os alelos S<sub>1</sub>, S<sub>3D</sub> e X. Estes foram os alelos que foram associados a um menor risco de desenvolver AR. Uma vez que não existiam diferenças significativas entre os alelos referidos, os autores optaram por juntá-los num grupo e denominá-lo de alelo “L”

O risco obtido na comparação entre S<sub>2</sub> e S<sub>3P</sub> foi superior para o primeiro (P<0.002). Pelo contrário, relacionando S<sub>3P</sub> com L, S<sub>3P</sub> apresentou um risco mais elevado (P<10<sup>-11</sup>).

Assim, du Montcel et al. concluíram que o alelo S<sub>2</sub>, ou seja, o que possui a sequência KRAA (HLA-DRB1 \*0401 e \*1303), é aquele que se associa a uma maior suscetibilidade à AR, enquanto que os alelos L foram considerados alelos que conferem um menor risco (no caso da sequência ERAA, o risco obtido foi igual ao dos alelos sem sequência RAA - X). Os alelos S<sub>3P</sub>, considerados de risco intermédio, são: HLA-DRB1 \*0101, \*0102, \*0404, \*0405, \*0408, \*1001 e \*1002.

No mesmo ano (2006), Michou et al. publicaram um estudo em que validaram a nova classificação dos alelos HLA-DRB1 sugerida por du Montcel et al., usando uma população francesa. Estes autores enfatizaram o impacto que esta nova classificação poderá ter em futuras pesquisas, podendo acrescentar novidades aos atuais conhecimentos nas áreas da fisiopatologia, clínica e genética da AR.

Liu et al. publicaram, em 2006, um artigo que estudava, numa população taiwanesa, a associação entre a AR e os alelos HLA-DRB1 que predispunham ou protegiam contra esta patologia.

Nesta população, os alelos \*0405 e \*1001 foram os que apresentaram maior risco para a AR. No primeiro caso, o valor de *odds ratio* era 4.04 e  $p_c$  era  $3.2 \times 10^{-14}$ , no segundo alelo, o valor do *odds ratio* era 5.25 e  $p_c$  era  $3.0 \times 10^{-3}$ . Os heterozigotos \*0405/\*1001 demonstraram possuir o mais alto risco para a doença quando comparados com o grupo de referência – não SE/não-SE (OR 15.8 e  $p_c$  0.004) e com o somatório de todos os outros grupos (OR 10.8 e  $p_c$  0.03).

Para estudar a influência dos alelos SE e DERAA no desenvolvimento da AR, Liu et al. dividiram os indivíduos da amostra em 6 genótipos: SE/SE, SE/não-SE, SE/DERAA, não-SE/não-SE, DERAA/não-SE, DERAA/DERAA. Os alelos considerados SE tinham nas posições 70 a 74 da cadeia DRB1 as sequências QKRAA, QRRAA ou RRRAA. Como alelos não-SE foram considerados todos os que não fossem alelos SE ou DERAA.

Comparando o risco de desenvolver AR entre os indivíduos com pelo menos 1 alelo SE e os indivíduos não-SE/não-SE, os primeiros possuíam um maior risco, tendo acontecido o mesmo quando se comparou indivíduos com pelo menos 1 alelo SE e o somatório de todos os outros grupos ( $p_c$   $5.02 \times 10^{-19}$ ). Já os indivíduos que possuíam pelo menos um alelo DERAA



não mostraram uma diminuição do risco de desenvolver AR com significância estatística ( $p_c$  0.06).

Indivíduos com genótipo DERAA/não-SE demonstraram um menor risco para a AR, no entanto este não foi estatisticamente significativo. Comparativamente ao somatório dos outros grupos, o genótipo não-SE/não-SE foi o que mostrou o mais baixo risco para esta doença (OR 0.31).

Al-Swailem et al. (2006) estudaram a associação dos alelos HLA-DRB1 em doentes sauditas com AR.

Ao efetuarem a tipagem dos alelos HLA-DRB1, os dois mais comuns entre os pacientes com AR foram \*04 e \*08 com  $P=0.0007$  e  $P=0.00012$ , respetivamente, o que sugere uma associação positiva entre ambos e esta patologia. Pelo contrário, os alelos \*06 foram os menos frequentes nos doentes com  $P=0.004$ , revelando uma possível associação negativa. Estas associações permitiram que os autores inferissem acerca de uma provável suscetibilidade à AR causada pelos alelos \*04 e \*08 em doentes sauditas. No caso dos alelos \*06, estes poderão estar envolvidos em efeitos protetores para a mesma doença em pacientes sauditas com AR.

Dentro dos alelos \*04 estudados (\*0401, \*0402, \*040301, \*040302, \*0404, \*0405, \*0406, \*0408, \*0410, \*0414 e \*0424), \*0405 foi o que apresentou um maior risco relativo (RR) ( $>1.2$ ), sugerindo uma associação positiva com a doença, enquanto que o alelo \*0406 apresentou um  $RR < 0.25$ , o que por sua vez sugere uma associação negativa com a doença.

Em 2008, Barnetche et al., à semelhança de Michou et al. em 2006, investigaram a relevância da nova classificação dos alelos HLA-DRB1 sugerida por du Montcel et al. em 2006. Este estudo foi efetuado em indivíduos com origem caucasiana e não caucasiana.

Tal como sugere a classificação de du Montcel et al., os indivíduos foram divididos em 5 grupos consoante os alelos HLA que apresentavam (ver quadro 4).

Os alelos S<sub>1</sub> e X apresentaram uma associação negativa quanto à suscetibilidade para a AR, enquanto os alelos S<sub>2</sub> e S<sub>3P</sub> apresentaram uma relação positiva como mesmo parâmetro. No caso dos alelos S<sub>3D</sub>, não foi possível identificar qualquer tipo de associação. Os resultados referidos estão esquematizados na **tabela 10**.

**Tabela 10** – Valores de *odds ratio* e significância estatística para a associação entre os 5 grupos da nova classificação de alelos HLA-DRB1 de du Montcel et al. e a suscetibilidade à AR (adaptado de [Barnetche et al. 2008])

Alelos	OR	P
S <sub>1</sub>	0.6	<10 <sup>-4</sup>
S <sub>2</sub>	2.15	<10 <sup>-5</sup>
S <sub>3P</sub>	2.74	<10 <sup>-5</sup>
S <sub>3D</sub>	0.89	0.89
X	0.58	4 x 10 <sup>-3</sup>

Comparando a distribuição dos diferentes genótipos nos indivíduos em estudo, assumindo o grupo “L” como a junção dos grupos S<sub>1</sub>, S<sub>3D</sub> e X e usando como referência o genótipo X/X, os resultados obtidos foram os seguintes (**Tabela 11**):

**Tabela 11** – Valores de *odds ratio* e significância estatística dos vários genótipos obtidos com a nova classificação de du Montcel et al. (adaptado de [Barnetche et al. 2008])

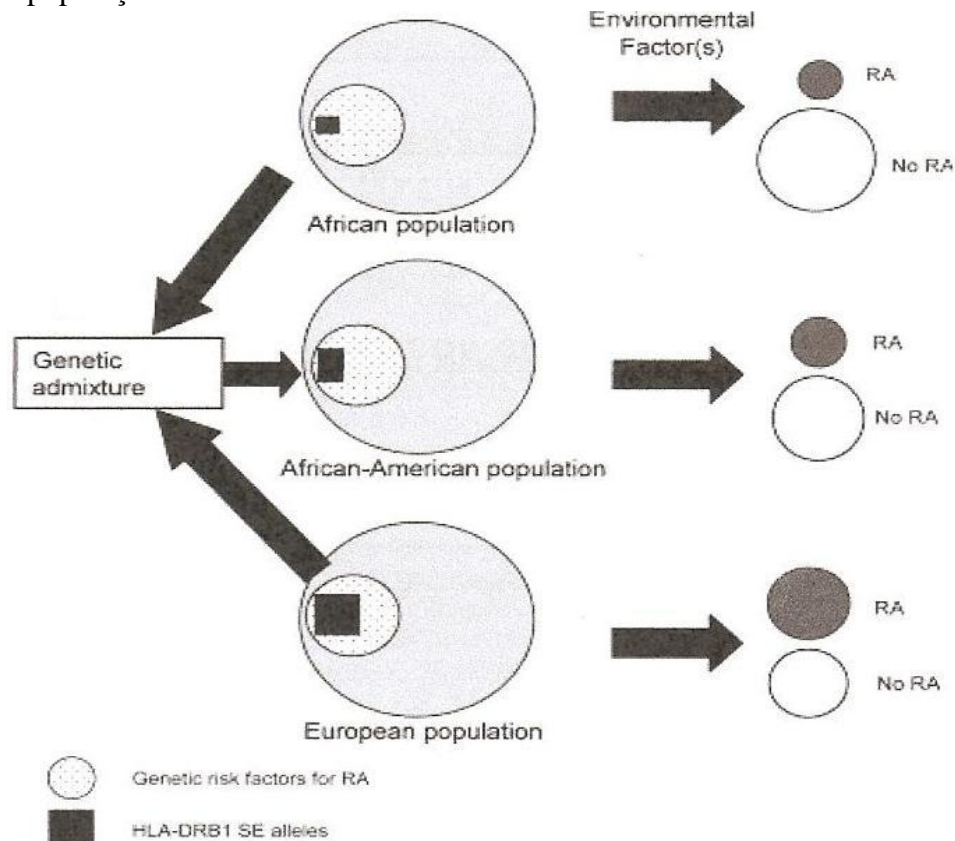
Genótipos	OR	P
S <sub>2</sub> /S <sub>3P</sub>	7.25	10 <sup>-5</sup>
S <sub>3P</sub> /S <sub>3P</sub>	5.15	10 <sup>-5</sup>
S <sub>2</sub> /S <sub>2</sub>	4.95	10 <sup>-4</sup>
S <sub>2</sub> /L	2.41	10 <sup>-4</sup>
S <sub>3P</sub> /L	2.33	10 <sup>-4</sup>

Um estudo sobre a associação entre os alelos HLA-DRB1 SE e a AR em afro-americanos foi realizado por Hughes et al. em 2008.

25,2% dos doentes com AR afro-americanos possuíam alelos SE contra 13,6% dos controlos (P=0.00005). Dos 166 controlos, 25,3% possuem pelo menos um alelo SE, enquanto que dos 321 doentes com AR, 42,1% possuem a mesma característica (P=0.0004).

Nos afro-americanos com ascendência europeia, 83% dos doentes com AR possuíam pelo menos um alelo SE contra 46% dos controlos.

A “mistura” de genes de origem europeia e afro-americana fez com que uma maior quantidade de doentes afro-americanos desenvolvessem AR, uma vez que passaram a ter maior número de alelos SE nos seus genótipos. A **figura 9** exemplifica um modelo teórico que pretende explicar o papel da “mistura” de genes europeus e afro-americanos na suscetibilidade ao desenvolvimento de AR. Para comparação, é também apresentado um esquema da população africana.



**Figura 9** – Modelo teórico do papel dos genes de ascendência europeia na suscetibilidade à AR em indivíduos afro-americanos [Hughes et al. 2008]

Assim, Hughes et al. puderam concluir que os alelos SE estão positivamente associados à suscetibilidade para desenvolver AR em indivíduos afro-americanos, embora esta contribuição seja menos marcada do que em indivíduos de ascendência europeia, sugerindo que a “mistura” de genes europeus e afro-americanos aumenta a suscetibilidade à doença.

Morgan et al. (2008) efetuaram um estudo em que avaliaram, entre outros aspetos, a classificação proposta por du Montcel et al. e o efeito protetor do ácido aspártico na posição

70 da cadeia DRB1 (tal como Matthey et al. já haviam feito) em indivíduos caucasianos residentes no Reino Unido.

Quanto à avaliação da classificação de du Montcel, este estudo confirmou a associação entre os alelos S<sub>2</sub> e S<sub>3P</sub> e a suscetibilidade à AR (OR 2.7 e 1.8, respetivamente). O genótipo X/X encontrava-se em menor número em pacientes do que nos controlos, sendo o valor de *odds ratio* 0.55. Um maior risco de desenvolver AR foi encontrado nos indivíduos que possuíam pelo menos um alelo S<sub>2</sub> ou S<sub>3P</sub>. Estes resultados estão em concordância com os que foram obtidos por du Montcel.

A avaliação de um possível efeito protetor do ácido aspártico na posição 70 da cadeia DRB1 mostrou que os indivíduos SE/D<sup>70+</sup> (ácido aspártico presente na posição 70) possuem um menor risco para desenvolver AR quando comparados com os SE/D<sup>70-</sup> (sem ácido aspártico na posição 70), estando este resultado em concordância com Matthey et al..

Em 2010, Balsa et al. realizaram um estudo, com o qual pretendiam analisar, entre outras vertentes, a associação entre os alelos HLA-DRB1 e a suscetibilidade à AR, numa população espanhola.

Os resultados obtidos encontram-se na **tabela 12**.

**Tabela 12** – Distribuição dos alelos SE pelos doentes e controlos. Valores de *odds ratio* e significância estatística da comparação entre ambos os grupos. [Balsa et al. 2010]

	Frequência alelos SE	OR	P
Doentes	56,2%	1,8	0.001
Controlos	41,6%		

Os autores definiram um efeito dos alelos SE “dose-dependente”, uma vez que encontraram uma maior frequência de 2 alelos SE em doentes do que nos controlos (14% e 5,6%, respectivamente, com OR 3.97), enquanto que se os indivíduos tivessem apenas um alelo SE, a frequência em doentes era 29,8% contra 24,9% nos controlos (OR 1.89).

Um estudo realizado no sul do Irão por Sandoughi et al. (2011), permitiu verificar que o alelo mais frequente em pacientes com AR é o \*10, sendo o menos frequente o alelo \*03 (OR 2.698, P 0.45 e OR 0.447 e P 0.021, respetivamente).

Assim, estes autores sugeriram que o alelo \*10 poderá estar associado à AR com um risco de suscetibilidade, enquanto o alelo \*03 poderá exercer um efeito protetor para esta patologia.

Um dos objetivos do estudo de Usnayo et al. (2011) era analisar a frequência de alelos HLA-DRB1 em doentes brasileiros. Os resultados demonstraram que os alelos DRB1 \*0401, \*0404 e \*0405 se associam à AR, sendo o valor de  $P < 0.05$ . Já os alelos DRB1 DERA mostraram ter um efeito protetor para a doença, sendo o valor de *odds ratio* 0.42 e o valor de  $P < 0.001$ .

## **7 - Anticorpos anti-CCP - Fisiopatologia**

Como doença auto-imune que é, a AR caracteriza-se pela existência de auto-anticorpos e linfócitos T auto-reactivos, que iniciam e perpetuam a inflamação, nomeadamente localizada às articulações sinoviais. [Steiner 2009]

Dos vários auto-anticorpos descritos nesta patologia, destacam-se dois fundamentais, o factor reumatóide (FR) e os anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado (Acs anti-CCP). [Steiner 2009]

A descoberta dos anticorpos anti-CCP foi um grande avanço na investigação da fisiopatologia da AR. Estes são produzidos por linfócitos B, a nível local e são, em comparação com o fator reumatóide, mais específicos (95% especificidade e 75% de sensibilidade) para a AR (o FR pode surgir noutras patologias e, inclusivamente, em pessoas saudáveis). [Steiner 2009]

A formação dos peptídeos citrulinados ocorre por uma modificação pós-translacional que transforma os resíduos de arginina em citrulina, através da ação da enzima peptidil arginina deaminase (PAD). Este processo de citrulinação ocorre sobretudo em células do citoesqueleto, tais como a filagrina, a vimentina e a citoqueratina. [Steiner 2009]

A presença dos anticorpos anti-CCP no soro dos doentes com AR parece estar relacionada com a componente genética desta doença, apesar de ainda não se saber concretamente quais os mecanismos associados a este processo. [Steiner 2009]

Estes anticorpos surgem em fases iniciais da doença, podendo, inclusivamente, ser detetáveis anos antes do desenvolvimento clínico. Em termos de valor prognóstico, a presença dos anticorpos anti-CCP correlaciona-se com a progressão radiográfica da doença,

nomeadamente com as erosões articulares características da AR, permitindo inferir que os anticorpos citados predizem o dano articular, que será pior na presença destes. [Steiner 2009]

Diversos estudos constataram que doentes com AR com anticorpos anti-CCP no seu soro têm pior prognóstico, uma vez que têm formas mais severas da doença. [Steiner 2009]



## 8 - Anticorpos anti-CCP e HLA-DRB1 – Existe ligação?

Em 2003, Hill et al. publicaram um estudo, com o qual pretendiam explicar qual o papel da citrulina no desencadear de uma resposta imunitária e qual a sua relação com a molécula de HLA-DRB1 \*0401. Para tal, usaram uma população de murinos transgênicos.

Estes autores testaram se havia um aumento da afinidade para peptídeos no alelo \*0401 (alelo escolhido pelo tamanho do P4 *Pocket* – interação favorável com peptídeos citrulinados), após a conversão da arginina em citrulina, tendo obtido como resultados: os peptídeos que continham arginina no P4 *Pocket* não desencadearam uma resposta imunitária (produção de citocinas e proliferação de linfócitos T); os peptídeos que continham citrulina no P4 *Pocket*, não só estimularam uma resposta imunitária com proliferação de linfócitos T, como também induziram a produção de interferão  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Outro objetivo deste estudo era determinar se a conversão da arginina em citrulina aumentava a afinidade da ligação dos peptídeos às moléculas de MHC classe II. Foram usados peptídeos de vimentina (Vim), o peptídeo não modificado Vim<sub>65-77</sub> e o peptídeo Vim<sub>R70Cit</sub> com citrulina em vez de arginina na posição 70. Dos alelos SE e não-SE testados, o peptídeo Vim<sub>R70Cit</sub> associou-se a um aumento de afinidade nos alelos SE \*0101 (100 vezes mais), \*0401 (90 vezes mais) e \*0404 (20 vezes mais), não tendo acontecido o mesmo com nenhum dos alelos não-SE. No caso do peptídeo Vim<sub>65-77</sub>, a ligação a todos os alelos testados (SE ou não-SE) foi média/fraca. Assim, Hill et al. verificaram que a conversão de arginina em citrulina aumenta 100 vezes mais a afinidade entre os peptídeos e as moléculas de MHC classe II que contenham alelos SE.

van Gaalen et al. (2004) efetuaram um estudo com o objetivo de avaliar a associação entre os genes HLA classe II e os anticorpos anti-CCP (IgG).

Dos alelos SE, \*0401 e \*1001 foram relacionados com a existência de anticorpos anti-CCP, pelo contrário, \*0301 não foi associado com a presença destes anticorpos.

Relativamente aos genótipos, 85% dos doentes SE/SE possuíam anticorpos anti-CCP, acontecendo o mesmo em 58% dos pacientes com genótipo SE/x e em 30% dos pacientes x/x.

Comparando a distribuição dos alelos SE (genótipos SE/SE e SE/x) em doentes anti-CCP positivos e negativos (com e sem anticorpos, respetivamente), os autores verificaram que estes foram encontrados em maior número nos doentes anti-CCP positivos.

Berglin et al. (2005) realizaram um estudo numa população sueca, que se propunha a investigar a presença de alelos SE (\*0401 e \*0404), anticorpos anti-CCP e fator reumatóide (FR) em indivíduos com AR.

Este estudo mostrou que a presença de genes SE, associadamente a anticorpos anti-CCP apresenta um elevado risco relativo de vir a desenvolver AR, isto porque a associação SE-Acs anti-CCP foi a que mostrou maior valor de *odds ratio*, como é descrito na **tabela 13**.

**Tabela 13** – Valores de *odds ratio* das diferentes combinações entre presença e ausência de genes SE e Acs anti-CCP no que toca ao futuro desenvolvimento de AR (adaptado de [Berglin et al. 2004])

Condição	OR
<b>Genes SE + Acs anti-CCP</b>	66.8
<b>Acs anti-CCp Sem Genes SE</b>	25.01
<b>Genes SE Sem Acs anti-CCP</b>	1.9

Os resultados deste estudo não referem uma associação direta entre os genes SE e a produção de Acs anti-CCP, contudo, os autores puderam concluir que existe um sinergismo entre estes dois parâmetros, uma vez que quando juntos, a suscetibilidade à AR é bastante elevada.

Huizinga et al. publicaram, em 2005, um estudo realizado em diferentes populações (holandeses e norte-americanos de origem caucasiana) que efetuou a comparação entre a frequência dos alelos SE em doentes com AR (com ou sem Acs anti-CCP) e indivíduos saudáveis (apesar de os títulos de Acs anti-CCP nos controlos não terem sido avaliados, os autores tiveram em conta estudos anteriores em que foi registada a total ausência destes Acs em indivíduos saudáveis).

Na população holandesa, a associação entre a presença de Acs anti-CCP e 2 cópias de SE revelou um *odds ratio* de 11.79, com  $P < 0.0001$ . Já o valor de *odds ratio* para a associação entre 1 cópia SE e a presença de anticorpos anti-CCP foi 4.37, sendo o valor de P igualmente inferior a 0.0001. Pelo contrário, em doentes com AR sem Acs anti-CCP não foi observada qualquer tipo de associação com os alelos *shared epitope* (OR 1.38 e  $P = 0.3$ , comparando controlos com indivíduos com 2 alelos SE; OR 1.29 e  $P = 0.2$  comparando controlos com indivíduos com 1 alelo SE).

Na população norte-americana, os alelos SE foram observados apenas nos doentes com Acs anti-CCP. Na **tabela 14**, estão registados os resultados de *odds ratio* e significância estatística obtidos nas associações entre a presença de Acs anti-CCP e 1 ou 2 cópias de alelos SE.

**Tabela 14** – Valores de *odds ratio* e significância estatística para as associações entre o número de cópias SE e a presença de Acs anti-CCP na população norte-americana estudada (adaptado de [Huizinga et al. 2005])

<b>Condição</b>	<b>OR</b>	<b>P</b>
<b>Acs anti-CCP + 1 cópia SE</b>	3.5	<0.0001
<b>Acs anti-CCP + 2 cópias SE</b>	7.7	<0.0001

Em 2006, van der Helm-van Mil et al. colocaram em dúvida se os alelos SE eram determinantes no desenvolvimento de AR com Acs anti-CCP ou se apenas se associavam à presença destes Acs em doentes com AR. Assim, realizaram um estudo para esclarecer esta questão. Outro objetivo deste estudo era analisar a importância dos alelos SE e dos Acs anti-CCP na progressão para AR de doentes com artrite indiferenciada.

Num total de 570 doentes com artrite indiferenciada, 177 vieram a desenvolver AR no primeiro ano de follow-up, os restantes doentes (alguns evoluíram para outras doenças e outros mantiveram artrite indiferenciada) foram considerados não-AR.

Nos 570 doentes considerados, foi avaliada a associação entre os alelos SE e os Acs anti-CCP, tendo-se verificado um valor de *odds ratio* de 3.1, com  $P < 0.001$ .

A influência dos alelos SE e dos Acs anti-CCP na progressão de artrite indiferenciada para AR foi avaliada. Para avaliar o papel dos genes SE na progressão para AR, os autores tiveram de realizar uma estratificação de acordo com a presença ou ausência de Acs anti-CCP. O resultado obtido demonstrou que, quer os doentes fossem portadores ou não de Acs anti-

CCP, os genes SE não foram associados com a progressão para a AR (OR 1.1 e P=0.8 nos doentes sem Acs e OR 0.4 e P=0.9 nos doentes com Acs).

Contrariamente, após a estratificação dos doentes em SE e não-SE, para testar o papel dos Acs anti-CCP na progressão de artrite indiferenciada para AR, os resultados foram: *odds ratio* de 10.1 e P<0.001 nos doentes não SE e *odds ratio* de 8.7 e P<0.001 nos doentes SE.

Deste modo, os autores concluíram que os alelos SE contribuem para o desenvolvimento de Acs anti-CCP, contudo, parecem não ser um fator de risco independente para a progressão de uma artrite indiferenciada para a AR.

Publicado em 2007, o artigo de Ligeiro et al. pretendia estudar a influência dos genes HLA-DRB1 na suscetibilidade à AR, bem como a importância destes genes na produção de Acs anti-CCP, numa população portuguesa.

Após a genotipagem dos doentes e dos controlos quanto aos alelos HLA-DRB1, obtiveram-se os resultados apresentados na **tabela 15**.

**Tabela 15** – Frequência da distribuição dos alelos HLA-DRB1\*04 e dos genótipos \*0101/2, \*0401/4/5/8/9 e \*1001 nos doentes com AR e nos controlos da população portuguesa. (adaptado de [Ligeiro et al. 2007])

Genotype	RA number (%) n = 141	Control number (%) n = 150	Odds ratio (95% CI)	p Value
DRB1*0101/02	38 (14.9)	30 (11.3)	1.48 (0.9 to 2.8)	NS
DRB1*04	63 (25.2)	26 (9.7)		
*0401	24 (8.9)	4 (1.3)	7.5 (2.5 to 22.2)	<0.001
*0402	7 (2.5)	5 (1.7)		NS
*0403	4 (1.4)	2 (0.7)		NS
*0404	14 (5.0)	5 (1.7)	3.2 (1.1 to 9.1)	0.03
*0405	18 (6.4)	10 (3.3)		NS
*0406	0	1 (0.3)		NS
*0407	0	1 (0.3)		NS
*0408	2 (0.7)	0		NS
*0409	1 (0.3)	1 (0.3)		NS
DRB1*0401/4/5/8/9	56 (21.3)	18 (6.7)	4.8 (2.7 to 8.8)	<0.001
DRB1*0402/3/6/7	7 (3.9)	8 (3.0)		NS
DRB1*1001	17 (6.0)	7 (2.3)	2.8 (1.1 to 7.0)	0.031

Assim, Ligeiro et al. concluíram que os alelos HLA-DRB1 \*04 e \*10 estão associados à AR em doentes portugueses. O primeiro grupo de alelos tinha já sido relacionado com a AR em estudos realizados em várias outras populações, enquanto que o segundo grupo tinha sido descrito apenas em populações mediterrânicas e hispânicas residentes na América do Norte. [Gonzalez-Gay et al. 2002]

Quanto à produção de Acs anti-CCP, os indivíduos com maiores títulos de Acs são os que possuem mais frequentemente os alelos \*04, como os \*10. De entre estes alelos, o único que atingiu significância estatística foi o \*0401 com OR de 7.5 e  $P < 0.001$ . No que toca a este Acs, os autores concluíram que os alelos SE funcionam como um fator de risco para a presença dos mesmos.

Poór et al. (2007) testaram se os alelos HLA-DRB1 se associam à presença de Acs anti-CCP numa população húngara.

A **tabela 16** mostra os resultados da associação entre a presença/ausência dos alelos HLA-DRB1 SE e a presença/ausência de Acs anti-CCP nos doentes com AR.

**Tabela 16** – Resultados da associação entre os alelos SE e não-SE e a presença/ausência de Acs anti-CCP em doentes com AR numa população húngara. [Poór et al. 2007]

	Anti-CCP positive ( <i>n</i> )	Anti-CCP negative ( <i>n</i> )	Total
SE-positive	144	41	185
SE-negative	27	49	76
Total	171	90	261

Chi-square = 42.69,  $P < 0.0001$ ; relative risk = 2.191 (95% CI: 1.603–2.995); OR = 6.374 (95% CI: 3.554–11.43).

Com estes resultados, os autores obtiveram uma associação estatisticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) com um valor de OR de 6.374, concluindo que os alelos HLA-DRB1 SE podem contribuir para a produção de Acs anti-CCP em doentes AR na população húngara.

As mesmas conclusões foram retiradas por Verpoort et al. (2007). Neste estudo, os autores utilizaram os dados de 2 estudos de coorte (o 1º estudava casos de *recent onset* AR; o 2º abordava uma estratégia de tratamento da AR), nos quais foram determinados os Acs anti-CCP derivados da vimentina (cVim) e os Acs anti-peptídeo citrulinado fibrinogénico (cFibr).

Os resultados alcançados podem ser visualizados na **tabela 17**.

**Tabela 17** - Relação entre os alelos SE e os Acs cVim e cFibr nos dois estudos de coorte estudados. (adaptado de [Verpoort et al. 2007])

1º estudo de coorte		OR
Alelos SE + cVim		4.95
Alelos SE + cFibr		1.71
2º estudo de coorte		OR
Alelos SE + cVim		5.05
Alelos SE + cFibr		1.19

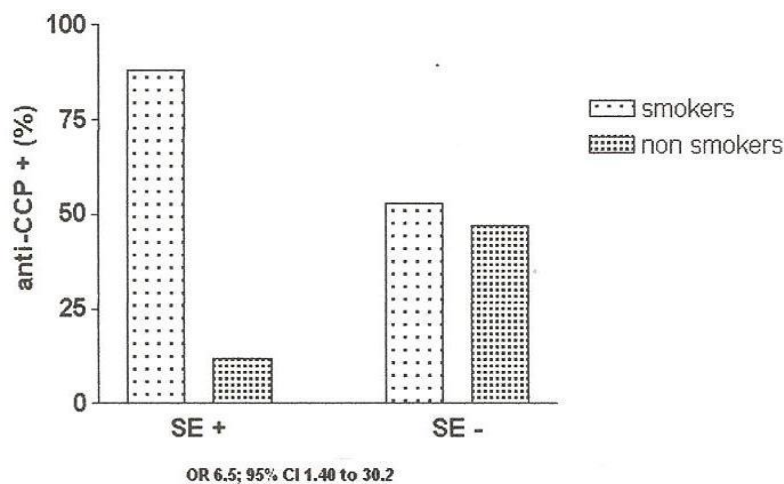
Analisando-se os 2 estudos de coorte como 1 só grupo, observou-se uma maior frequência de Acs cVim nos indivíduos SE positivos (OR 4.44 e  $P < 10^{-6}$ ), concluindo-se que os alelos SE desempenham um papel importante na produção de Acs específicos da AR.

No já referido estudo efectuado em 2008 por Hughes et al., utilizando uma amostra de indivíduos afro-americanos, os autores concluíram que 48,9% dos doentes que possuíam Acs anti-CCP tinham pelo menos um alelo SE, indicando a existência de uma associação estatisticamente significativa entre estes alelos e os Acs referidos ( $P=0.01$ ).

Contrariamente aos resultados obtidos em todos os artigos anteriormente referidos, Xue et al. (2008) verificaram que a produção de Acs anti-CCP não está associada à presença de alelos SE (OR 1.920 e  $p=0.2899$ ). Verificaram, também, que apesar de os alelos SE se associarem à AR em doentes chineses (OR 2.42 e  $p=0.01$ ), estes alelos são menos prevalentes nesta população do que em populações caucasianas, sugerindo que outros locus deverão estar associados à AR.

Em 2008, Oliveira et al. investigaram o papel dos alelos SE na associação entre a produção de Acs anti-CCP e o tabaco numa população de doentes brasileiros com AR.

Após vários testes, verificou-se uma associação positiva entre os doentes com AR, os alelos SE e a produção de anticorpos anti-CCP no grupo de doentes fumadores (OR 0.95). A **figura 10** demonstra as associações entre os doentes SE positivos e negativos, fumadores e não fumadores e Acs anti-CCP positivos.



**Figura 10** – Frequência de Acs anti-CCP em doentes fumadores e não fumadores, de acordo com a presença ou ausência de alelos SE numa população brasileira. [Oliveira et al. 2008]



Este estudo (que tem a mais-valia de ter sido realizado numa população com variadas origens étnicas, uma vez que a população brasileira contém vários imigrantes europeus, africanos, entre outros) permitiu concluir que, em indivíduos geneticamente suscetíveis, o tabaco atua como um fator de risco para a produção de Acs anti-CCP.

Em 2009, El-Gabalawy et al. publicaram um estudo que determinou a prevalência dos Acs anti-CCP numa população de Norte-Americanos nativos com AR e seus parentes em primeiro grau e a relação entre os alelos SE e o alelo não-SE \*0901 com a AR e Acs anti-CCP.

Os autores verificaram que os alelos SE, \*0901 e o genótipo SE/\*0901 se relacionavam com a AR, no entanto, o genótipo SE/\*0901 foi o que mais se relacionou com o desenvolvimento precoce da doença (antes dos 16 anos, com OR 11.2 e  $p < 0.0001$ ).

A frequência de Acs anti-CCP foi de 82% nos doentes, 17% nos parentes em primeiro grau e 11% em parentes mais distantes, revelando um maior risco de desenvolver a doença em parentes mais próximos.

Lundstrom et al. (2009) estudaram o efeito dos alelos HLA-DRB1 não-SE no desenvolvimento de AR com e sem Acs anti-CCP.

Quanto aos resultados obtidos, os autores verificaram que os alelos \*03, \*07, \*08, \*13, \*14 e \*15 conferiam protecção contra a AR com Acs anti-CCP, ao contrário dos alelos SE estudados (\*01, \*04 e \*10). Verificaram, também, que após estratificação para a presença ou ausência de alelos SE, o alelo \*13 foi o único a conferir protecção para a AR com Acs anti-CCP, independentemente da presença ou ausência de alelos SE (RR 0.41).

Pelo contrário, observou-se que o genótipo \*13/\*03 estava significativamente associado a uma maior suscetibilidade de vir a desenvolver AR sem Acs anti-CCP, mostrando que estes alelos desempenham funções opostas na patogenia da AR.

van der Woude et al. (2009), numa meta-análise efectuada em 4 populações europeias (Suécia, Noruega, Holanda e Espanha) para investigar que alelos HLA-DRB1 estariam associados à protecção contra a AR com ou sem Acs anti-CCP, observaram, tal como Lundstrom et al., que apenas os alelos \*13 conferiam protecção (OR 0.54).

De entre os vários alelos \*13, van der Woude et al. registaram que o alelo \*1301 foi o único que se associou à protecção contra a AR com Acs anti-CCP (OR 0.24). Esta associação foi mais forte nas populações do Norte da Europa.

Quanto à relação protetora entre os alelos HLA-DRB1 e a AR sem Acs anti-CCP, estes autores não encontraram associações estatisticamente significativas.

Gyetvai et al. (2010) usaram a nova classificação dos alelos HLA-DRB1 SE de du Montcel et al. e determinaram a influência de cada grupo de alelos ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_{3P}$  e  $S_{3D}$ ) na produção de Acs anti-CCP, tendo como grupo de referência o genótipo X/X (alelos não-SE). Assim, Gyetvai et al. obtiveram os seguintes resultados (**Tabela 18**):

**Tabela 18** – Valores de significância estatística obtidos para a associação entre os grupos  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_{3P}$  e  $S_{3D}$  (nova classificação de du Montcel et al.) e a produção de Acs anti-CCP. (adaptado de [Gyetvai et al. 2010])

Grupo de Alelos	P (associação entre os alelos e a produção de Acs anti-CCP)
$S_1$	0.01

$S_2$	<0.0001
$S_{3P}$	0.004
$S_{3D}$	0.027

Desta forma, os autores concluíram que a predisposição para a formação de Acs anti-CCP se associa segundo uma hierarquia:  $S_2+S_{3P}>S_1+S_{3D}>X/X$ .

Singwe-Ngandeu et al. (2010) verificaram que os doentes africanos com AR tinham altos títulos de Acs anti-CCP. Esta elevada prevalência de Acs anti-CCP, apesar da baixa frequência de alelos SE (menor do que em populações europeias como referido por Hughes et al.), permitiu aos autores concluírem que outros determinantes genéticos estarão por trás da patogenia da AR na população africana.

Tal como já referido, Balsa et al. (2010) realizaram um estudo em que pretendiam analisar a influência dos alelos HLA-DRB1 na suscetibilidade ao desenvolvimento de AR e, também, na produção de Acs anti-CCP e fator reumatóide, numa população espanhola.

Balsa et al. verificaram que os alelos HLA-DR3 (\*03) e os alelos com a sequência DERA não diferiam muito em termos de suscetibilidade para a AR (OR 1.53 e OR 1.33, respectivamente). Ambos foram encontrados com maior frequência nos controlos do que nos doentes com AR, sugerindo um efeito protetor para a doença. Também associado a estes alelos, foram registados menores títulos de Acs anti-CCP, mais uma vez demonstrando que, provavelmente, estes alelos determinam uma componente protetora na patogenia da AR.

Vários autores tinham já colocado em dúvida se a AR com Acs anti-CCP e a AR sem Acs anti-CCP seriam duas doenças distintas. Ohmura et al. (2010), colocaram esta questão,

discutindo se os estudos que afirmavam que a AR sem Acs anti-CCP não se associava aos alelos SE, tinham obtido estes resultados graças ao facto de os indivíduos considerados sem Acs anti-CCP, não seriam também, na sua maioria, indivíduos sem AR ou outras doenças reumáticas. Assim, Ohmura et al. investigaram esta questão, excluindo todos os indivíduos que não apresentassem erosões articulares.

Os resultados obtidos demonstraram que a AR sem Acs anti-CCP não se associava aos alelos SE ( $P=0.43$  e  $P=0.16$  para 2 ou 1 cópia de alelos SE, respetivamente), confirmando as conclusões alcançadas em estudos anteriores.

## **Conclusões e Perspetivas**

---

Muitos avanços foram feitos no século XX, contudo, em pleno século XXI, a etiopatogenia da artrite reumatóide ainda não é completamente compreendida. Foram identificados alguns mecanismos e variados possíveis agentes causais, no entanto, ainda há muito a percorrer neste campo.

Vários artigos abordam o tema da suscetibilidade à artrite reumatoide por parte dos alelos HLA-DRB1. Consoante as populações estudadas, os estudos revelaram diferentes resultados, permitindo concluir que a componente genética da doença é variável geograficamente e etnicamente.

Além disso, é importante não esquecer que são vários os fatores ambientais apontados como interligados com esta doença. Assim sendo, é necessário interpretar os resultados obtidos à luz de todas as variáveis existentes, nomeadamente tendo em conta outros fatores, tais como os ambientais.

Apesar das discrepâncias encontradas nos vários artigos estudados, compreende-se que os alelos HLA-DRB1 podem ter uma relação de suscetibilidade e de proteção no que toca ao desenvolvimento da artrite reumatoide.

Os alelos HLA-DRB1 contendo a sequência *shared epitope* foram, em vários estudos, considerados como os alelos de maior risco para o desenvolvimento da doença. De destacar o alelo DRB1 0401, um dos mais frequentemente apontados nos artigos estudados, como referem, por exemplo, Fries et al. (2002).

Ficou, também, claro que a existência de dois alelos contendo a sequência *shared epitope* (homozigotia) conferia maior suscetibilidade ao desenvolvimento da doença do que a presença de apenas um alelo SE.

No que concerne à questão da proteção exercida pelos alelos HLA-DRB1, foram, essencialmente, os alelos com a sequência DEERA nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável da cadeia DRB1 da molécula de HLA-DRB1 que demonstraram, em vários estudos incluídos neste artigo, uma tendência para um menor risco de desenvolvimento de artrite reumatoide. [van der Helm-van Mil et al. 2005]

Em alguns estudos, foi estudada a influência no risco de desenvolver a doença na presença/ausência do aminoácido ácido aspártico na posição 70 da terceira região hipervariável da cadeia DRB1 da molécula de HLA-DRB1. Entre outros, Ruiz-Morales et al. (2004), Balsa et al (2010), concluíram que a presença do ácido aspártico (D) na posição 70 conferia proteção para a artrite reumatoide, sendo essa tendência protetora maior quando existiam dois alelos com este aminoácido na posição 70.

A relação entre a artrite reumatoide, o HLA-DRB1 e a presença de anticorpos anti-CCP tem sido alvo de estudo de vários investigadores. No entanto, a relação entre a doença e estes dois fatores ainda não se encontra totalmente clarificada.

Nos vários artigos estudados, foi possível depreender que os alelos HLA-DRB1, nomeadamente, os alelos com a sequência *shared epitope*, se associam à presença de anticorpos anti-CCP nos doentes com artrite reumatoide. No entanto, não foi possível inferir, diretamente, uma relação de causalidade.

Póor et al (2007), Hughes et al (2008), entre outros, chegaram à mesma conclusão, estudando diferentes populações. Ambos afirmaram que os alelos SE estão associados à presença de anticorpos anti-CCP, podendo estar envolvidos na produção destes mesmos anticorpos.

Singwe-Ngandeu et al. (2010) verificaram que na população africana existem elevados títulos de anticorpos anti-CCP apesar da baixa frequência de alelos SE, permitindo inferir que outros determinantes genéticos deverão estar implicados.

Apesar de vários estudos terem evidenciado a ligação entre os alelos HLA-DRB1 e a presença de anticorpos anti-CCP em indivíduos com artrite reumatoide, Xue et al. (2008), demonstraram, a estudar uma população chinesa, que estes anticorpos não estão associados aos alelos HLA-DRB1. Além disso, Xue et al. evidenciaram que os alelos com a sequência *shared epitope* são menos prevalentes em doentes chineses, comparativamente com doentes europeus, pelo que seria importante investigar que outros componentes genéticos estarão envolvidos na etiopatogenia da artrite reumatóide.

Em suma, consoante os alelos HLA-DRB1 em causa, estes conferem uma tendência para a suscetibilidade ou para a proteção quanto ao desenvolvimento de artrite reumatóide. Os efeitos destes alelos na produção de anticorpos anti-CCP não estão bem esclarecidos, uma vez que não foi, ainda, possível inferir um efeito de causalidade. A presença de ambos parece conferir um efeito sinérgico, aumentando a suscetibilidade à artrite reumatóide. Contudo, em algumas populações estudadas, a associação entre a presença destes alelos e dos anticorpos anti-CCP não foi comprovada, pelo que este assunto é merecedor de novas investigações futuramente.

Não só esta vertente em específico, mas também toda a etiopatogenia da artrite reumatóide será, certamente, alvo de novos estudos científicos. A excelência e a qualidade dos resultados obtidos até agora permitiram uma melhor compreensão da doença, trazendo novas terapêuticas e outras perspectivas aos doentes com artrite reumatoide, sempre tentando melhorar a qualidade de vida destes doentes.

## **Bibliografia**

---

- 1- Al-Swailem R et al. (2006) HLA-DRB1 association in Saudi rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 26 (11): 1019-1024
- 2 Balandraud N et al. (2003) Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 48 (5): 1223-122
- 3 Balsa A et al. (2010) Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther* 12 (2): R62
- 4 Barnetche T et al. (2008) New classification of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis susceptibility: a combined analysis of worldwide samples. *Arthritis Res Ther* 10 (1): R26
- 5 Berglin E et al. (2004) A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6 (4): R303-308
- 6 Criswell LA et al. (2002) Cigarette smoking and the risk of rheumatoid arthritis among postmenopausal women: results from the Iowa's Women's Health Study. *Am J Med* 112 (6): 465-471
- 7 Deighton CM et al. (1989) The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* 36 (3): 178-182
- 8 Deighton CM et al. (1992) Specificity of the proteus antibody response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 51 (11): 1206-1207
- 9 du Montcel et al. (2005) New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 52 (4): 1063-68



- 10 Eguchi K et al. (1996) High seroprevalence of anti-HTLV-I antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39 (3): 463-466
- 11 El Gabalawy HS et al. (2009) Immunogenetic risks of anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in a north american native population with rheumatoid arthritis and heir first-degree relatives. *J Rheumatol* 36 (6): 1130-1135
- 12 Fries JF et al. (2002) HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: frequency, severity and treatment bias. *Arthritis Rheum* 46 (9): 2320-2329
- 13 Gilbert M et al. (2003) Functional categorization of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis: the protective effect. *Hum Immunol* 64 (10): 930-935
- 14 Goldsby RA et al. (2003) *Kuby Immunology*. Amherst: W.H. Freeman
- 15 Gonzalez-Gay MA et al. (2002) Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 31 (6): 355-360.
- 16 Goronzy JJ, Weyand CM (2001) Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis. *Trends Immunol* 22 (5): 251-255
- 17 Gregersen PK et al. (1987) The shared epitope hypothesis – an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30 (11): 1205-1213
- 18 Guthrie KA et al. (2010) Does pregnancy provide vaccine-like protection against rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 62 (7): 1842-1848
- 19 Gyetvai A et al. (2010) New classification of the shared epitope in rheumatoid arthritis: impact on the production of various anti-citrullinated protein antibodies. *Rheumatology (Oxford)* 49 (1): 25-33

- 20 Hill JA et al. (2003) Cutting Edge: The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1 \*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 171 (2): 538-541
- 21 Hughes LB et al. (2008) The HLA-DRB1 shared epitope is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in african americans through european genetic admixture. *Arthritis Rheum* 58 (2): 349-358
- 22 Huizinga TW et al. (2005) Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 52 (11): 3433-3438
- 23 Jawaheer D et al. (2006) Influence of male sex on disease phenotype in familial rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54 (10): 3087-3094
- 24 Karlson EW et al. (2003) Coffee consumption and risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48 (11): 3055-3060
- 25 Karlson EW et al. (2004) Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurse's Health Study. *Arthritis Rheum* 50 (11): 3458-3467
- 26 Khuder et al. (2002) Environmental risk factor for rheumatoid arthritis. *Rev Environ Health* 17 (4): 307-315
- 27 Kindt T et al. (2007) *Inmunología de Kuby*. Santa Fé: McGraw-Hill Interamericana.
- 28 Ligeiro D et al. (2007) Influence of human leucocyte antigen-DRB1 on the susceptibility to rheumatoid arthritis and on the production of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in a portuguese population. *Ann Rheum Dis* 66 (2): 246-248. Epub 2006 Jun 22

- 29 Liu SC et al. (2006) Influence of HLA-DRB1 genes and the shared epitope on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Twainese. *J Rheumatol* 34 (4): 674-680
- 30 Lundstrom E et al. (2009) Opposing effects of HLA-DRB1 \*13 alleles on the risk of developing anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60 (4): 924-930
- 31 MacGregor et al. (2000) Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 43 (1): 30-37
- 32 Maini RN et al. (1995) Aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Models and mechanisms od rheumatoid arthritis* (Henderson B et al., ed) pp25-46. San Diego: Academic Press
- 33 Matthey et al. (2001) HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 protect against development of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28 (2): 232-239
- 34 Maxwell JR et al. (2010) Alcohol consumption is inversely associated with risk and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 49 (11): 2140-2146.
- 35 Michou et al. (2006) Validation of the shared epitope HLA-DRB1 classification in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8 (3): R79
- 36 Mikuls TR (2010) Help stop tooth decay...and prevent RA? *J Rheumatol* 37 (6): 1105-1112
- 37 Morgan AW et al. (2008) The shared epitope hypothesis in rheumatoid arthritis: evaluation of alternative classification criteria in a large UK Caucasian cohort. *Arthritis rheum* 58 (5): 1275-1283
- 38 Ohmura K et al. (2010) Anti-citrullinated peptide antibody-negative RA is a genetically distinct subset: a definitive study using only bone-erosive ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 49 (12): 2298-2304. Epub 2010 Sep 9

- 39 Oliveira RD et al. (2008) Shared epitope, citrullinated cyclic peptide antibodies and smoking in Brazilian rheumatoid arthritis patients. *Clin Rev Allergy Immunol.* 34 (1): 32-35
- 40 Ou et al. (1999) A new categorization of HLA DR alleles on a functional basis. *Hum Immunol* 59 (10): 665-676
- 41 Peschken CA, Esdaile JM. (1999) Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples. *Semin Arthritis Rheum* 28 (6): 368-391
- 42 Pladevall-Vila et al. (1996) Controversy of oral contraceptives and risk of rheumatoid arthritis. *Am J Epidemiol* 144(1): 1-14
- 43 Poór G et al. (2007) Genetic background of anti-cyclic citrullinated peptide autoantibody production in Hungarian patients with rheumatoid arthritis.
- 44 Reviron D et al. (2001) Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44 (3): 535-540
- 45 Ruiz-Morales JA et al. (2004) HLA-DRB1 alleles encoding the "shared epitope" are associated with susceptibility to developing rheumatoid arthritis whereas HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the  $\beta$ -chain are protective in Mexican Mestizos. *Hum Immunol* 65 (3): 262-269
- 46 Saag KG et al. (1997) Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Ann Rheum Dis*: 56 (8): 463-469
- 47 Sandoughi M et al. (2011) Frequency of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis patients in Zahedan, southeast Iran. *Ann Saudi Med* 31 (2): 171-173
- 48 Silman AJ et al. (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 32 (10): 903-907
- 49 Silva JA (2005) *Reumatologia Prática*. Lisboa: Diagnóstico

- 50 Singwe-Ngandeu M. et al. (2010) Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptides and association with HLA-DRB1 shared epitope alleles in African rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 12 (2): R36
- 51 Skare T. (1999) *Reumatologia – Princípios e Prática*. Paraná: Guanabara Koogan
- 52 Statsny P. (1976) Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 57: 1148-1157
- 53 Steiner G et al. (2009) Autoantibodies: Diagnostic Helpers and Pathogenetic Players. In: *Rheumatoid Arthritis* (Hochberg MC et al., ed) pp180-190 Philadelphia: Mosby Elsevier
- 54 Stolt P et al. (2005) Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis* 64(4): 582-586
- 55 Toussirot E et al. (1999) HLA-DRB1 alleles and shared amino acid sequences in disease susceptibility and severity in patients from eastern France with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26 (7): 1446-1451
- 56 Usnayo MJ et al. (2011) Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol* 51 (5): 465-483
- 57 van der Helm-van Mil AH (2005) An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis Rheum* 52 (9): 2637-2644
- 58 van der Helm-van Mil AH et al. (2006) The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54 (4): 1117-1121

- 59 van der Woude D et al. (2009) Protection against anti-citrullinated antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1 \*1301. *Arthritis Rheum* 62 (5): 1236-1245
- 60 van Gaalen FA et al. (2004) Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50 (7): 2113-2121
- 61 Verpoort KN et al. (2007) Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 56 (12): 3949-3952
- 62 Xue Y et al. (2008) The HLA-DRB1 shared epitope is not associated with antibodies against cyclic citrullinated peptide in chinese patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 37 (3): 183-187
- 63 Wolfe F (2000) The effect of smoking on clinical, laboratory and radiographic status in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27 (3): 630-637
- 64 Wucherpfenning KW (2006) HLA and Autoimmunity: Structural Basis of Immune Recognition. In: *Immunogenetics of autoimmune disease* (Oksenberg J, Brassat D, ed) pp1-12. Berlin: Springer
- 65 Zhang D. et al. (1997) Detection of rubella, mumps, and measles virus genomic RNA cells from synovial fluid and peripheral blood in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24 (7): 1260-1265