

# Estudo de HLA classes I e II em trinta pacientes equatorianos com artrite reumatoide em comparação com alelos de indivíduos saudáveis e afetados com outras doenças reumáticas

María Verónica Aguirre Arias<sup>1</sup>, Emilia Vázquez Domingues<sup>2</sup>, Rodrigo Barquera Lozano<sup>3</sup>, Carlos Vallejo Flores<sup>4</sup>, Marilú Mestanza Peralta<sup>4</sup>, Camilo Zurita Salinas<sup>5</sup>

## RESUMO

**Introdução:** A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica sistêmica autoimune que provém de uma desordem incapacitante. Até hoje, a etiologia da AR é desconhecida. No entanto, já se cogitou a existência de indivíduos geneticamente passíveis de tê-la. Muitos estudos já foram realizados em todo o mundo, como, por exemplo, na Polônia, Argentina, Chile, México, Brasil, Colômbia, entre outros países, com relação à influência entre os alelos HLA-DR e a doença, mas não no Equador. **Objetivo:** O principal objetivo deste estudo foi determinar a participação dos alelos de HLA classes I e II em pacientes com AR. **Pacientes e Métodos:** Esta pesquisa foi desenvolvida em 30 pacientes adultos com AR, previamente diagnosticados de acordo com os critérios de classificação do Colégio Norte-Americano de Reumatologia (ACR, 1987) e 28 controles. Para a tipificação de HLA classes I e II, adotou-se a técnica PCR-SSP, e as significâncias estatísticas foram avaliadas pelo teste de Qui-Quadrado. **Resultados:** O HLA-DR4 está presente em 76,7% dos pacientes, com uma frequência alélica de 45%, enquanto apenas 21% dos sujeitos controle o apresentaram. O teste de Qui-Quadrado confirma que as variáveis HLA-DR4 e RA estão altamente vinculadas ( $X^2 = 11,38$ ,  $P = 0,00074$ ). **Conclusão:** Há frequência maior de HLA-DR4 e HLA-DR14. Os resultados encontrados são similares aos encontrados em outros estudos. Porém, seria desejável aumentar o tamanho da amostra para encontrar um maior número de perfis genéticos e de alelos envolvidos.

**Palavras-chave:** artrite reumatoide, HLA-DR4, alelo, PCR – SSP.

## INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune, crônica e de caráter progressivo, e sua herança é considerada complexa e poligênica. A prevalência dessa doença na América Latina é de cerca de 0,4%, com uma taxa de 0,24%-1,0%.<sup>1</sup> Embora a etiologia dessa doença não seja conhecida, já foram considerados diversos fatores de risco e tem-se mencionado a presença de indivíduos geneticamente passíveis de tê-la, com a influência de fatores do humor e celulares que acabam levando a um processo de ativação imunológica.<sup>2</sup>

O Antígeno de Leucócitos Humanos (*Human Leukocyte Antigen*, HLA), codificado pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*, MHC), passou a ser associado à AR desde 1976. Tanto a natureza dessa associação quanto a incidência variam de acordo com os grupos étnicos e, em diversos estudos, já foi bem documentada. Na Europa, em um estudo realizado por Ploski *et al*, em pacientes poloneses e lituanos, associam-se HLA-DR1 e HLA-DR4 à vulnerabilidade.<sup>3</sup> Turesson *et al*. argumentam que um tipo de HLA-DR4 esteve presente em 105 de 151 pacientes com AR extra-articular,<sup>4</sup> enquanto Cittera *et al*. o

Recebido em 02/07/2009. Aprovado, após revisão, em 09/06/2010. Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

Biologia Molecular de Zurita & Zurita Laboratórios; coordenado por Reumaceb (Centro de Estudos Biomédicos).

1. Engenheira em Biotecnologia (Escola Politécnica do Exército), com tese em graduação de Reumaceb – Centro de Estudos Biomédicos Zurita & Zurita Laboratórios.

2. Engenheira em Biotecnologia responsável pela área de Biologia Molecular de Zurita & Zurita Laboratórios. Quito, Equador.

3. Químico Farmacêutico Biológico do Laboratório de Genética Molecular da Escola Nacional de Antropologia e História da UNAM. México DF, México.

4. Médicos reumatologistas com tratamento pelo Reumaceb (Centro de Estudos Biomédicos). Quito, Equador.

5. Médico imunologista investigador de Zurita & Zurita Laboratórios. Quito, Equador.

Endereço para correspondência: María Verónica Aguirre Arias. Ambato, Equador. Tel/fax: (593-3) 2841-055. E-mail: maveagar@yahoo.com.

encontraram em 70 dos 140 pacientes estudados.<sup>5</sup> O objetivo deste estudo foi determinar a participação dos alelos de HLA classes I e II na suscetibilidade ao padecimento de AR em pacientes equatorianos.

## PACIENTES E MÉTODOS

Todos os participantes receberam a explicação sobre o teor do processo e, de forma livre e voluntária, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sem que sua decisão compromettesse a relação médico-paciente ou o tratamento a ser seguido. O estudo, em todos seus princípios e metodologias, contou com a aprovação do Comitê Equatoriano de Bioética.

### Pacientes

Foram analisados 30 pacientes equatorianos maiores de 18 anos com diagnóstico de AR de acordo com os critérios do Colégio Norte-Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology*, ACR, 1987); não foram avaliados pacientes sem diagnóstico confirmado ou histórico clínico completo. A faixa etária dos pacientes ficou entre 25 e 54 anos, com uma média de 43,3 anos (25 do sexo feminino e 5 do sexo masculino).

### Controles

Foram 28 adultos maiores de 18 anos sem diagnóstico de AR, distribuídos entre indivíduos saudáveis ( $n = 12$ ), espondilite soronegativa ( $n = 13$ ) e osteoartrose ( $n = 3$ ). A idade dos controles oscilou entre 26 e 65 anos, com uma média de 45,3 anos. Desses controles, 11 foram homens (3 saudáveis e 8 com espondilite soronegativa), e 17 foram mulheres (9 saudáveis, 5 com espondilite soronegativa e 3 com osteoartrose).

### Estudo imunogenético

Para os pacientes e controles que fizeram parte da pesquisa, houve a coleta de 5 mL de sangue por flebotomia em um tubo com anticoagulante  $K_3$ EDTA. De cada uma dessas amostras, extraiu-se o DNA pelo método de *Salting out* (Miller S et al., 1988). Os alelos HLA classes I e II foram determinados por PCR-SSP (Pel-Freez HLA-A/B/DR/DQ SSP Unitray®, BrownDeer, Wisconsin, USA). Esse método se baseia na técnica de PCR e confere resolução dos níveis baixos aos níveis altos dos diferentes tipos de HLA classes I e II. A bandeja térmica de 96 vasilhas inclui a formulação de diversos *primers*, um tampão de reação no qual se incorpora o DNA numa concentração de 100 ng/uL e Taq polimerase. A

mistura desses três elementos se junta à bandeja, e se procede à vedação e ao posterior ciclo térmico da seguinte maneira: passo 1 – 1 minuto a 96°C; passo 2 – cinco ciclos de 96°C por 25 segundos, 70°C por 50 segundos, 72°C por 45 segundos; passo 3 – 21 ciclos de 96°C por 25 segundos, 65°C por 50 segundos, 72°C por 45 segundos; passo 4 – quatro ciclos de 96°C por 25 segundos, 55°C por 60 segundos, 72°C por 120 segundos; e manutenção a 4°C, até sua carga em gel de agarose em 2% adicionando brometo de etídio. Finalmente, realizaram-se eletroforese e fotodocumentação dos géis de agarose e foi feita a interpretação dos resultados.

### Frequência alélica

A Frequência Alélica (FA) é definida como a percentagem em que se apresenta um alelo específico a respeito dos outros subtipos encontrados, que também podem ocupar o mesmo *locus* e deve distinguir-se da percentagem simples de indivíduos que têm um alelo em particular. O primeiro parâmetro é calculado contando as vezes em que aparece um alelo numa população, dividido pelo número total de alelos e multiplicado por 100.<sup>16</sup> O segundo parâmetro só indica a percentagem de indivíduos que, homocigótica ou heterocigoticamente (sem discriminação), possuem o alelo e, portanto, seus valores são diferentes do primeiro.

Onde:

FA = Frequência Alélica (em percentagem).

a = Número de vezes que aparece um alelo na população do estudo (em casos de homocigose, a contagem é dupla).

N = Número total de alelos que se apresentam na população em estudo.

### Estatística e projeto experimental

Os resultados foram avaliados pelo teste de Qui-Quadrado (Qui<sup>2</sup>), com a correção estatística de comparação de contrastes múltiplos de Bonferroni, para determinar a associação das variáveis qualitativas HLA e AR. Procurou-se a frequência alélica (FA) para quantificar a proporção de cada alelo a respeito da totalidade de alelos existentes.

## RESULTADOS

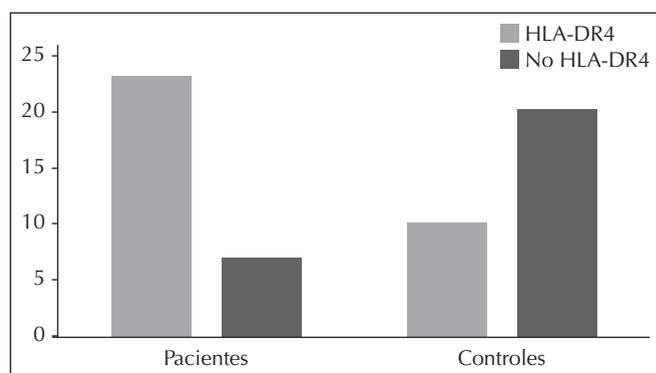
### Alelos HLA-DR4

As percentagens mais altas encontradas em pacientes correspondem ao alelo HLA-DR4, presente em 23 dos 30 indivíduos diagnosticados com artrite reumatoide (Figura 1). Em quatro desses, apresenta-se em homocigose e, em cinco, aparece

**Tabela 1**

Frequências alélicas em pacientes e controles. Os valores estão expressos em porcentagens

Alelos	Pacientes	Controles	Alelos	Pacientes	Controles	Alelos	Pacientes	Controles	Alelos	Pacientes	Controles	Alelos	Pacientes	Controles
A2	36,67	21,67	B35	31,67	16,67	DR4	45,00	21,67	DRB4	60,00	33,33	DQ8 (3)	36,67	25,00
A24 (9)	30,00	20,00	B65 (14)	3,33	1,67	DR103	3,33	5,00	DRB3	25,00	30,00	DQ7 (3)	33,33	21,67
A68 (28)	10,00	3,33	B61 (40)	13,33	10,00	DR1	10,00	6,67	Null	8,33	20,00	DQ5 (1)	10,00	16,67
A11	6,67	13,33	B39 (16)	15,00	13,33	DR11 (5)	5,00	13,33	DRB5	6,67	16,67	DQ6 (1)	6,67	15,00
A1	3,33	3,33	B62 (15)	3,33	0,00	DR14 (6)	18,33	3,33				DQ2	0,00	11,67
A23 (19)	0,00	3,33	B7	6,67	8,33	DR9	8,33	6,67				DQ9 (3)	11,67	6,67
A33 (19)	1,67	3,33	B60 (40)	3,33	0,00	DR15 (2)	3,33	13,33				DQ4	1,67	1,67
A26 (10)	1,67	0,00	B44 (12)	1,67	1,67	DR16 (2)	3,33	5,00				DQX	0,00	1,67
A43	1,67	0,00	BX	3,33	0,00	DR10	1,67	1,67						
A29 (19)	1,67	3,33	B37	3,33	0,00	DR8	1,67	6,67						
A30 (19)	1,67	5,00	B51 (5)	3,33	3,33	DR17 (3)	0,00	5,00						
A31 (19)	1,67	5,00	B50 (21)	1,67	0,00	DR13 (6)	0,00	6,67						
A32 (19)	1,67	5,00	B53	1,67	1,67	DRX	0,00	1,67						
A3	1,67	13,33	B8	1,67	0,00	DR7	0,00	3,33						
			B56 (22)	1,67	3,33									
			B27	1,67	15,00									
			B48	1,67	3,33									
			B57 (17)	1,67	0,00									
			B18	0,00	11,67									
			B41	0,00	3,33									
			B45 (12)	0,00	1,67									
			B13	0,00	1,67									
			B47	0,00	1,67									
			B40	0,00	1,67									

**Figura 1**

Distribuição do alelo HLA-DR4 em pacientes e controles (coluna clara). Os alelos da classe DR diferentes de DR4 aparecem na coluna escura.

combinado com o -DR1. A frequência alélica corresponde a 45%. Esse mesmo alelo estava nos sujeitos controle com uma frequência de 21%. A Tabela 1 mostra todas as frequências alélicas encontradas.

No grupo controle, o tal alelo estava em 4 dos 12 indivíduos sadios e em 5 dos 13 pacientes de espondiloartrite soronegativa. No entanto, nos pacientes com osteoartrose, não se encontrou o mencionado alelo.

#### Alelos HLA-DR14

O HLA-DR14 aparece em 8 pacientes com AR (FA = 18%), dos quais 2 apresentam o HLA-DR14 em combinação com o -DR4. No grupo controle, esse alelo encontrou-se em dois indivíduos, um saudável e outro com espondiloartrite soronegativa.

### Alelo HLA-B27

Apresenta-se com uma frequência de 1,67% em pacientes e 15% dos controles, situação que significa que 13 dos sujeitos controle padecem de espondiloartrite soronegativa, doença amplamente associada à presença desse alelo.<sup>1</sup>

Na Tabela 2, aparecem os valores estatisticamente mais importantes, que foram obtidos nos alelos HLA: -DR4, -DR14, a combinação -DR4 mais -DR14, -DR9, -DQ8, DQ7 e -B27. Nos demais alelos encontrados, as significâncias obtidas são descartáveis.

### Suscetibilidade à AR

Realizou-se um teste de Qui-Quadrado, com um intervalo de confiança de 95%, com base nas tabelas de contingência com correção estatística de Bonferroni e um limite de significância  $P = 0,05$ . Com a mencionada análise estatística, podemos concluir que o HLA-DR4 está significativamente associado à suscetibilidade de parecer AR ( $Qui^2 = 11,38$  e  $P = 0,00074$ ), como também HLA – DR14 ( $Qui^2 = 6,40$  e  $P = 0,0113$ ). A Tabela 2 mostra as significâncias estatísticas mais importantes obtidas.

Também foi comparada, isoladamente, a estatística dos alelos DR4 e DR14, que foram os mais importantes entre os pacientes e os controles sadios, obtendo-se para -DR4 os valores de  $Qui^2 = 12,81$  e  $P = 0,0003$ , o que confirma a associação de AR com esse alelo. Para DR14, não se encontrou associação importante, como se descreve na Tabela 3.

## DISCUSSÃO

No Equador, nos limites de nosso conhecimento, esta é a primeira pesquisa realizada abordando a associação entre HLA e AR. A significância estatística mais importante encontrada

**Tabela 2**

Frequências alélicas na artrite reumatoide *versus* controles: valores de  $Qui^2$  e significância estatística

Alelos encontrados	$Qui^2$	P
HLA-DR4	11,38	0,00074
HLA-DR14	6,40	0,0113
HLA-DR4 + HLA-DR14	$6,80 \times 10^{-5}$	0,9934
HLA-DR9	0,1307	0,7176
HLA-DQ8	1,6685	0,1964
HLA-DQ7	0,2777	0,5981
HLA-B27	0,0113	0,9153

**Tabela 3**

Frequências alélicas em porcentagens de pacientes com artrite reumatoide em contraste com indivíduos sadios agrupados por sexo

Alelos	Frequência Alélica em Pacientes (n = 30)	Frequência Alélica em Controles Sadios (n = 12)	$Qui^2$	P
-DR4	45%	5%	12,81	0,0003
-DR14	18%	1,67%	1,71	0,1908

nesse grupo de pacientes equatorianos corresponde ao alelo DR4 que está presente em 23 dos 30 pacientes. Valores similares têm sido indicados previamente em pesquisas realizadas em outros países, como o de Citera *et al.*, na Argentina, em 2001, no qual 70 de 140 pacientes apresentam esse alelo.<sup>5</sup>

Em outro estudo realizado em uma população peruana, 28 de 52 pacientes (53,8%) apresentam HLA-DR4,<sup>6</sup> enquanto Turesson *et al.* mostram, em outra pesquisa, o indicador positivo do supracitado alelo em 69,5% dos pacientes com AR extra-articular.<sup>4</sup> Será necessário, portanto, verificar a participação desse alelo nas manifestações somáticas da doença e nos padrões sorológicos de diagnóstico característicos.

Diferentemente do anterior, a descoberta desse alelo é muito menor em uma população controle saudável. Na presente pesquisa, nós o encontramos em 4 dos 12 indivíduos sadios (33,3%), enquanto na pesquisa de Citera aparece em 23,3% dos 202 pesquisados e, no Peru, em 29,7% dos 81 controles.<sup>5,6</sup> Quanto ao restante da população controle, dos pacientes com espondiloartropatia soronegativa ( $n = 13$ ), 38,5% apresentam DR4.

O alelo HLA-DR14 mostra significância estatística dentro do grupo de pacientes pesquisados. Faz-se necessária uma análise com mais pacientes em um estudo posterior, sem que se possa, por ora, descartar ou afirmar sua associação com a doença de maneira categórica. Isso porque, de fato, o subtipo HLA-DRB1\*1402 prevalece em nativos norte-americanos – dentre quais a AR é considerada uma doença frequente,<sup>6</sup> embora eles tenham se mostrado geneticamente diferentes da população equatoriana.

A2 e A24<sup>9</sup> apresentam frequências alélicas importantes (36,6% e 30%), mas não possuem relevância para a doença. Sua presença foi confirmada numa população mestiça mexicana (32,2% e 16,4%, respectivamente),<sup>7</sup> como também em espanhóis da Múrcia e peruanos. De forma similar, isso ocorre com HLA-B35 e -B39(16), cuja frequência se encontra em 31,7% e 16,7%, respectivamente, em habitantes mestiços me-

xicanos, náuatles, quéchuas, mixteques, peruanos e habitantes da Europa Central.<sup>8</sup>

Como se constatou nos resultados, o HLA B27 tem importante presença nos sujeitos controle (15% de frequência alélica), diferentemente dos pacientes em que se apresenta com uma FA de 1,67%. Essa frequência em controles se justifica porque B27 é um gene altamente associado à espondiloartropatia soronegativa, característica que tem sido mundialmente descrita com frequência na literatura. Portanto, não deve ser interpretado como um alelo que tenha papel de proteção.

Dentre os alelos encontrados no grupo de estudo, a frequência alélica de HLA-DQ8 e HLA-DQ7 não apresenta qualquer associação com a doença. Foram relatados previamente em diversos grupos étnicos: asiáticos, negroides e caucasianos; e essa informação foi encontrada de acordo com os estudos realizados em brasileiros, mexicanos, escandinavos, hindus, japoneses e coreanos.<sup>9-12</sup>

Na América Latina, existem importantes estudos realizados no Brasil e na Colômbia. No Brasil, é importante frisar a pesquisa feita por Louzada, Júnior e Donadi, publicada em 2008. Nela, faz-se uma tipificação de HLA por meio de alta resolução em 140 pacientes e 161 controles, entre brancos, negros e mulatos, encontrando vários subtipos de HLA – DR4. As frequências alélicas mais importantes são as dos alelos; \*0401, com 7,5%; \*0404, com 7,5%; e \*0405, com 4,7%; todos do tipo DR4. Também, e de maneira preponderante, temos o alelo DRβ\*0101, com 12,1%<sup>13</sup> de frequência alélica em pacientes e 4,35% em controles, num intervalo de confiança de 95%. Nosso estudo mostra valores semelhantes, de 10% e 6,67%, respectivamente, mesmo que numa amostra menor, embora sem significância estatística importante ( $P > 0,05$ ). Tudo isso sugere a realização de um estudo mais aprofundado, com maior resolução, para encontrar os subtipos de DR4, como também estender o tamanho da amostra.

Na Colômbia, cuja mestiçagem é semelhante à do Equador, destaca-se a pesquisa realizada por Juan Manuel Anaya em 83 mulheres que têm AR; 39 delas são DR4 positivo<sup>14</sup> (46,7%). Ao analisarmos nossos dados, 19 das 26 mulheres que participaram da pesquisa são portadoras desse alelo, representando 73% do grupo do sexo feminino. Em outra pesquisa de HLA realizada por Correa e Anaya em 100 sujeitos saudáveis não relacionados da região noroeste desse país, o alelo DR4 está presente em 8,5%.<sup>15</sup> Entre nossos controles sadios ( $n = 12$ ), a frequência alélica está em 4,1%, mas tanto essa porcentagem

nos pacientes sadios quanto nas mulheres atingidas pode variar com a inclusão de novos sujeitos.

Os resultados obtidos nos pacientes pesquisados demonstram que principalmente o HLA-DR4 tem significância estatística e é passível de padecer de artrite reumatoide, sem descartar que -DR14, -B35, -DR9 e outros alelos também podem estar associados à doença. Apesar disso, e como já explicado, a significância estatística do HLA-DR4 encontrado nesta pesquisa – associado ao forte desenvolvimento da doença – encontra-se referendada pelos resultados de estudos prévios já efetuados. De qualquer maneira, seria desejável verificar a presença desses alelos e de suas significâncias estatísticas de associação com um número maior de pacientes, envolvendo também as características clínicas e os parâmetros de avaliação sorológicos e radiológicos próprios dessa doença.

Os alelos encontrados como associados à doença neste e em outros estudos realizados na América Latina, HLA-DRB1\*04 e -DRB1\*14, subtipos \*1402 e \*1406\*, coincidem com os encontrados como prevalentes em várias populações nativas norte-americanas ou misturadas com elas, o que nos revela a existência de um fator étnico entre os componentes que predis põem ao padecimento de AR. Esse tipo de pesquisa contribui para melhorar o conhecimento da frequência e da distribuição das variantes associadas por toda a região, e oferece mais oportunidades para esclarecer seu mecanismo, contribuindo com dados sobre a prevalência dos alelos, a força da associação e outros componentes genéticos e ambientais, compartilhados ou exclusivos das populações analisadas.

Da mesma forma, outros sistemas gênicos dentro ou fora da região do HLA devem ser pesquisados para a construção dos genótipos completos que influenciam no desenvolvimento e no prognóstico da doença, como, por exemplo, os polimorfismos da região geradora do TNF- $\alpha$ <sup>1</sup> e PTPN22,<sup>16</sup> cuja associação com a fisiopatogênese já foi demonstrada.

## CONCLUSÃO

Existem pesquisas semelhantes bem documentadas na literatura científica mundial, mas também encontramos que, dentro do grupo pesquisado, o HLA DR4 está fortemente associado ao padecimento de AR. Encontramos também significância estatística, dentro do grupo analisado ao alelo HLA DR14, mas sua participação na doença ainda não foi acolhida nem descartada por meio da análise de uma amostra mais abrangente.

## REFERÊNCIAS

### REFERENCES

1. Delgado-Vega AM, Martín J, Granados J, Anaya JM. Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿Qué esperar de América Latina? *Biomédica* 2006; 26:562-84.
2. Anaya J. Artritis reumatoide. Bases moleculares, Clínicas y terapéuticas. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín, Colombia; 2006.
3. Ploski R, Butrimiene I, Kaminska E, Valiukiene K, Sliwinska P, Kubasiewicz E *et al.* Rheumatoid arthritis in Poland and Lithuania: different clinical course and HLA associations despite similar genetic background. *Annals of Rheumatic Diseases* 2005; 64(1):165-66.
4. Turesson C, Schaid D, Weyand C, Jacobsson L, Goronzy J, Pettersson I *et al.* The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2005. Disponível em <http://arthritis-research.com/content/7/6/R1386>. Acessado em 02 de junho de 2010.

5. Citera G, Padulo L, Fernández G, Lazaro M, Rosemffet M y Maldonado-Cocco J. Influence of HLA-DR alleles on rheumatoid arthritis: susceptibility and severity in Argentinean patients. *The Journal of Rheumatology* 2001; 28(7):1486-91.
6. Angulo J, Miraval T, Ponce de León H, Reivelle J. Epitope reumatoide y alelo HLA-DRB1\*0404 se asocian con susceptibilidad para artritis reumatoide en mestizos peruanos, alelo HLA-DRB1\*1402 en duda y la combinación maligna \*0401/0404 ausente. *Revista Peruana de Reumatología* 2001; 9(1):26-32.
7. Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, Acuña-Alonzo V, Montoya-Gama K, Moscoso J *et al.* HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Molecular Immunology* 2008; 45(4):1171-78.
8. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, Gómez-Casado E, Longas J, Gonzales-Hevilla M *et al.* Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 2000; 56(5):405-16.
9. Tokunaga K, Omoto K, Akaza T, Akiyama N, Amemiya H, Naito S, Sasazuki T *et al.* HLA ethnic study of Japanese and Koreans. *Immunogenetics* 1985; 22(4):359-64.
10. Gorodezky C. Genetic difference between Europeans and Indians tissues and blood types. *Allergy Proc* 1992; 13(5):243-50.
11. Madsen M, Graugaard B, Lamm LU, Jorgensen F, Kissmeyer-Nielsen F. HLA genes and haplotypes in the Scandinavian populations. *Tissue Antigens* 1981; 18(3):275-80.
12. Singal D, D'Souza, M. Distribution of HLA antigens in Asian Indians. *Transplantation Proceedings* 1991. 23(7):459-63.
13. Louzada-Júnior P, Freitas MV, Oliveira RD, Deghaide NH, Conde RA, Bertolo MB *et al.* A majority of Brazilian patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1 alleles carry both the HLA-DRB1 shared epitope and anti-citrullinated peptide antibodies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008; 41(6):493-9.
14. Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD, Arcos-Burgos M. Rheumatoid arthritis association in Colombian population is restricted to HLA-DRB1\*04 QRRAA alleles. *Genes and Immunity* 2002; 3:56-8.
15. Correa PA, Whitworth WC, Kuffner T, McNicholl J, Anaya JM. HLA-DR and DRB1 gene polymorphism in the North-western Colombian population. *Tissue Antigens* 2002; 59(5):436-9.
16. Garavito G. Asociación HLA y Artritis Reumatoidea Juvenil: En busca de las bases moleculares dependiente del MHC. Tesis Doctoral. Universidad del Norte – Colombia, 2003.
17. Chang M, Rowland CM, Garcia VE, Schrodi SJ, Catanese JJ, van der Helm-van Mil AH *et al.* A large-scale rheumatoid arthritis genetic study identifies association at chromosome 9q33.2. Disponible em <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000107>. Acessado em 02 de junho de 2010.