MARCOS SOARES TAVARES

Estudo caso-controle da região HLA de pacientes com Granulomatose com poliangeíte

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Pneumologia
Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Valente Barbas

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tavares, Marcos Soares
Estudo caso-controle da região HLA de pacientes com granulomatose com poliangiíte / Marcos Soares Tavares. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pneumologia.
Orientadora: Carmen Sílvia Valente Barbas.

Descritores: 1.Granulomatose com poliangiíte 2.Alelos 3.Reação em cadeia da polimerase 4.Teste de histocompatibilidade 5.Genes MHC da classe I 6. Genes MHC da classe II 7.Predisposição genética para doença 8.Frequência do gene 9.Herança multifatorial 10.Grupos étnicos 11.Brasil 12.Estudos de casos e controles

USP/FM/DBD-217/16

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais Mario e Edna, que me deram apoio e souberam suportar minha ausência durante o tempo em que me dediquei à Medicina com respeito e carinho.

Esta obra também é resultado do esforço de vocês.

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a todas as pessoas que colaboraram de forma direta ou indireta para que esta tese fosse realizada e especialmente:

À Professora Dra. Carmen Silvia Valente Barbas, orientadora desta tese e responsável pela minha formação em Pneumologia e Medicina Intensiva desde a residência até o doutorado. Obrigado pela oportunidade de ter sido seu orientando, pela dedicação e pelos ensinamentos que me fizeram acreditar e concluir esta tese.

Aos meus pais Mario e Edna, aos quais devo todas as minhas conquistas.

Ao meu irmão André pela parceria em todos os momentos e pelo exemplo de dignidade e honestidade.

Ao meu tio Edison pelo seu enorme entusiasmo e incentivo pelo conhecimento acadêmico.

À minha namorada Andressa pelo companheirismo, pela paciência, pelo carinho e pela ajuda durante toda esta trajetória.

À Professora Doutora Rosana Câmara Agondi, coautora e idealizadora desta tese, principalmente pelo seu comprometimento e pelos ensinamentos na área de Imunologia.

Ao Dr. Hélcio Rodrigues, responsável pelo Laboratório de Imunologia e Histocompatibilidade do Instituto do Coração, por me receber de braços abertos em seu laboratório e pela sua grande disposição em repassar seu conhecimento em Histocompatibilidade, além de toda a ajuda para aquisição do material laboratorial e no processo de tipificação do HLA. Sem sua ajuda este tese nunca teria saído do papel.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia e Histocompatibilidade do Instituto do Coração, pela ajuda técnica em todas as fases de tipificação do HLA, em especial a Celia e a Carol.

Ao Bernardo Santos pela ajuda em toda a análise estatística da tese.

Aos amigos do Ambulatório de Vasculites Pulmonares, Telma, Letícia e Juliana.

À disciplina de Pneumologia pela oportunidade de realizar esta tese.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

- Referências: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

RESUMO

Tavares MS. Estudo caso-controle da região HLA de pacientes com Granulomatose com poliangeíte [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Os alelos HLA-DPB1*04 e HLA-DRB1*15 estão fortemente associados à Granulomatose com poliangeíte (GPA). Neste estudo, analisamos se os pacientes brasileiros com diagnóstico de GPA apresentam uma base genética na região HLA. Conduzimos um estudo caso-controle, em que analisamos os alelos da região HLA classe I e II em 55 pacientes com diagnóstico de GPA, atendidos no ambulatório de Vasculites Pulmonares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e comparamos com os resultados de 110 controles saudáveis. Comparamos também quatro diferentes apresentações clínicas da GPA e a positividade do anticorpo anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) com os alelos da região HLA classe I e II. Foi também construída uma árvore de decisões, usando o algoritmo de CART, para a verificação da associação entre os alelos HLA e GPA. Como resultados, observamos que a GPA esteve fortemente associada à presença dos alelos DPB1*04 e DRB1*15 (p = 0,007, odds ratio [OR]: 2,9, 95% intervalo de confiança [IC]: 1,09–3,8; p = 0,006, OR: 2,87, 95% IC: 1,44–4,75, respectivamente) e não à presença do alelo DRB1*04. O alelo DRB1*13 esteve associado com proteção contra GPA (p = 0,042, OR: 0,42, 95% CI: 0,21–0,99). O alelo DPB1*04 esteve significativamente associado a GPA e ANCA-C positivo (OR: 5,47) e à presença de insuficiência renal aguda (p = 0,01037). Concluímos que houve uma interdependência significativa entre os alelos DPB1*0401, DPB1*0402, DRB1*13, C*2 e GPA. Na população estudada, quando o alelo DPB1*04 esteve presente em homozigose, o risco de GPA foi de 81%. Quando o alelo DPB1*0401 esteve ausente ou em heterozigose com o DPB1*0402, como o outro alelo, ou DPB1*0402 esteve em homozigose, o risco da GPA foi de 52,9%. No caso de ausência dos alelos DPB1*0401, DPB1*0402 e DRB1*13, a presença do alelo C*2 aumentou o risco da GPA para 62,5%. Finalmente, na ausência do alelo DPB1*0401 e DPB1*0402 e na presença do alelo DRB1*13, o risco de GPA diminuiu para 0%.

Descritores: 1. Granulomatose com poliangiíte 2. Alelos 3. Reação em cadeia da polimerase 4. Teste de histocompatibilidade 5. Genes Classe I do complexo de histocompatibilidade (MHC) 6. Genes Classe II do Complexo de Histocompatibilidade (MHC) 7. Predisposição genética para doença 8. Frequência do gene 9. Herança multifatorial 10. Grupos étnicos 11. Brasil 12. Estudos de casos e controles.

ABSTRACT

Tavares MS. Case-control study of HLA region in Brazilian carriers of Granulomatosis with Polyangiitis (Wegener's) [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

The alleles HLA-DPB1*04 and HLA-DRB1*15 are strongly associated with granulomatosis with polyangiitis (GPA). In this study, we examined whether Brazilian patients with GPA had an HLA region genetic background. We conducted a case-control study, in which we analysed alleles of HLA region class I and II from 55 patients with GPA (at the Pulmonary Vasculitis Clinic of the University of São Paulo) and compared the results with those from 110 healthy controls. Comparisons were also performed for 4 different clinical presentations of GPA and anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) positivity and the HLA class I and II region alleles. A tree model decision analysis was conducted using CART algorithm. Our results showed that GPA was strongly associated with alleles DPB1*04 and DRB1*15 (p = 0.007, odds ratio [OR]: 2.9, 95% confidence interval [CI]: 1.09–3.8; p = 0.006, OR: 2.87, 95% CI: 1.44–4.75, respectively) and not with the allele DRB1*04. DRB1*13 allele was associated with protection against GPA (p = 0.042, OR: 0.42, 95% CI: 0.21–0.99). DPB1*04 was significantly associated with GPA plus positive C-ANCA (OR: 5.47) and acute renal failure (p = 0.01037). We concluded that there was a significant interdependence among alleles and GPA. In our population, when allele DPB1*04 was presented in homozygous, the risk of GPA was 81%. When DPB1*0401 allele was absent or heterozygous with DPB1*0402 as the other allele, or DPB1*0402 was homozygous, the risk of disease was 52.9%. If DPB1*0401, DPB1*0402, and DRB1*13 were absent, the presence of C*2 increased the risk of GPA to 62.5%. Finally, in the absence of DPB1*0401 and DPB1*0402 and the presence of DRB1*13, the risk of GPA decreased to 0%.

Descriptors: granulomatosis with polyangiitis; alleles; polymerase chain reaction; histocompatibility testing; genes, MHC class I; genes, MHC class II;genetic predisposition to disease; gene frequency; multifactorial inheritance; ethnic groups; Brazil; case-control studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação das vasculites	2
Figura 2	Histologia	3
Figura 3	ANCA C e P, Anti-Lamp-2 e Anti-pentraxin-3	5
Figura 4	Nariz em sela e Tomografia computadorizada de seios da face	6
Figura 5	Radiografia de tórax e Tomografia computadorizada de tórax	7
Figura 6	Tomografia de emissão de pósitrons (PET –CT)	8
Figura 7	Distribuição geográfica da GPA	11
Figura 8	Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH)	15
Figura 9	Mapa do cromossomo 6 humano	16
Figura 10	Estrutura das moléculas de HLA classe I e classe II	19
Figura 11	Fluxograma do estudo	29
Gráfico 1	Manifestações clínicas do grupo GPA	39
Gráfico 2	Árvore de decisões	46
Figura 12	Manifestações clínicas com diferentes intensidades	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alelos HLA classe II associados à GPA nas diferentes populações do mundo	22
Tabela 2	Sexo e idade de pacientes e controles	37
Tabela 3	Cor da pele dos indivíduos do grupo GPA	37
Tabela 4	Frequência e porcentagem de ANCA, ANCA C e ANCA P nos pacientes do grupo GPA	38
Tabela 5	Equilíbrio de Hardy-Weinberg	40
Tabela 6	Avaliação da frequência dos alelos: DPB1*04; DRB1*15; DRB1*04 e DRB1*13	41
Tabela 7	ANCA positivo *versus* controle	42
Tabela 8	ANCA C positivo *versus* controle	42
Tabela 9	Análise de significância entre ANCA Positivo x controle, ANCA Negativo x Controle e ANCA Negativo x ANCA Positivo	43
Tabela 10	Análise de significância entre ANCA C positivo x controle, ANCA C Negativo x Controle e ANCA C Negativo x ANCA C Positivo	43
Tabela 11	Comparação de OR entre os grupos	44
Tabela 12	Associação DPB1*04 e DRB1*15 com IRA nos indivíduos com GPA	44
Tabela 13	Distribuição de raça por estado brasileiro	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Dra.: Doutora

Fig.: Figura

N: Número

Profa.: Professora

LISTA DE SIGLAS

AAT: Alfa-1 antitripsina

ANTI - MBG: Anticorpo antimembrana basal glomerular

ACR: *American College of Rheumatology*

ANCA: *Antineutrophil cytoplasmic antibodies* (anticorpo anticitoplasma de neutrófilos)

ANCA-C: ANCA padrão citoplasmático

ANCA-P: ANCA padrão perinuclear

Anti-LAMP-2: *Anti–lysosome-associated membrane protein 2* (anticorpo associado à proteína 2 de membrana lisossomal)

ASN: *American Society of Nephrology*

BVAS*: Birmingham Vasculitis Activity Score*

CAPPesp: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CHCC: *Chapel Hill Consensus Conference*

CPH: Complexo Principal de Histocompatibilidade

CTAB: *Cetrimonium bromide* (brometo de hexadeciltrimetilamônio)

CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico)

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DTAB: *Dodecyltrimethylammonium bromide* (brometo de dodeciltrimetilamônio)

EDTA**:** *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EULAR: *European League Against Rheumatism*

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GPA: Granulomatose com poliangeíte

GWAS: *Genome-wide association study* (estudos de associação genômica ampla)

GPAE: Granulomatose com poliangeíte eosinofílica

HC: Hospital das Clínicas

HLA: *Human Leukocyte Antigen* (antígeno leucocitário humano)

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCOR: Instituto do Coração

IRA: Insuficiência renal aguda

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

MPO: Mieloperoxidase

OR: *Odds ratio*

PAM: Poliarterite microscópica

PCR-SSO: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotides* (Reação de polimerização em cadeia utilizando oligonucleotídes de sequência específica)

PCR-SSP: *Polymerase Chain Reaction-sequence Specific Primers* (Reação de polimerização em cadeia utilizando a sequência específica de primers)

PR3: Proteinase 3

PRTN3: Gene que codifica a proteinase 3

PTPN22: Gene que codifica a tirosina fosfatase linfoide

Rpm: Rotação por minuto

SAPE: Solução estreptavidina conjugada com ficoeritrina

SEMA6A: Gene que codifica a proteína semaforina 6A

SERPINA1: Gene que codifica a enzima α 1-antitripsina

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

USA: *United States of America*

VAA: Vasculites ANCA associadas

LISTA DE SÍMBOLOS

μl: Microlitro

nm: Nanômetro

^{o}C: Graus Celsius

λ: Lambda

SUMÁRIO

1 Introdução 1
1.1 Definição 2
1.2 Nova nomenclatura 3
1.3 Papel do anticorpo anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) na Granulomatose com poliangeíte 4
1.4 Manifestações Clínicas da Granulomatose com poliangeíte 5
1.5 Manifestações radiológicas da Granulomatose com poliangeíte 6
1.6 Diagnóstico da Granulomatose com poliangeíte 8
1.7 Terapêutica e prognóstico da Granulomatose com poliangeíte 9
1.8 Epidemiologia e Expressão Fenotípica da Granulomatose com poliangeíte 10
1.9 Etiologia e fatores de risco da Granulomatose com poliangeíte 12
1.10 Terminologias genéticas 13
1.11 Genética na Granulomatose com Poliangeíte 13
1.12 Complexo principal de histocompatibilidade e nomenclatura 14
1.13 Expressão das moléculas MHC e apresentação antigênica 17
1.14 Associações entre HLA e GPA 20
2 Hipótese 23
3 Objetivo 25
3.1 Objetivo primário 26
3.2 Objetivo secundários 26
4 Métodos 27
4.1 Delineamento do estudo 28
4.2 Grupo de pacientes com GPA 30
4.3 Grupo controle 32
4.4 Metodologia laboratorial 32
4.5 Falhas de tipagem em alelos isolados 34
4.6 Análise estatística 34
5 Resultados 36
5.1 Casuística 37
5.2 Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) 39

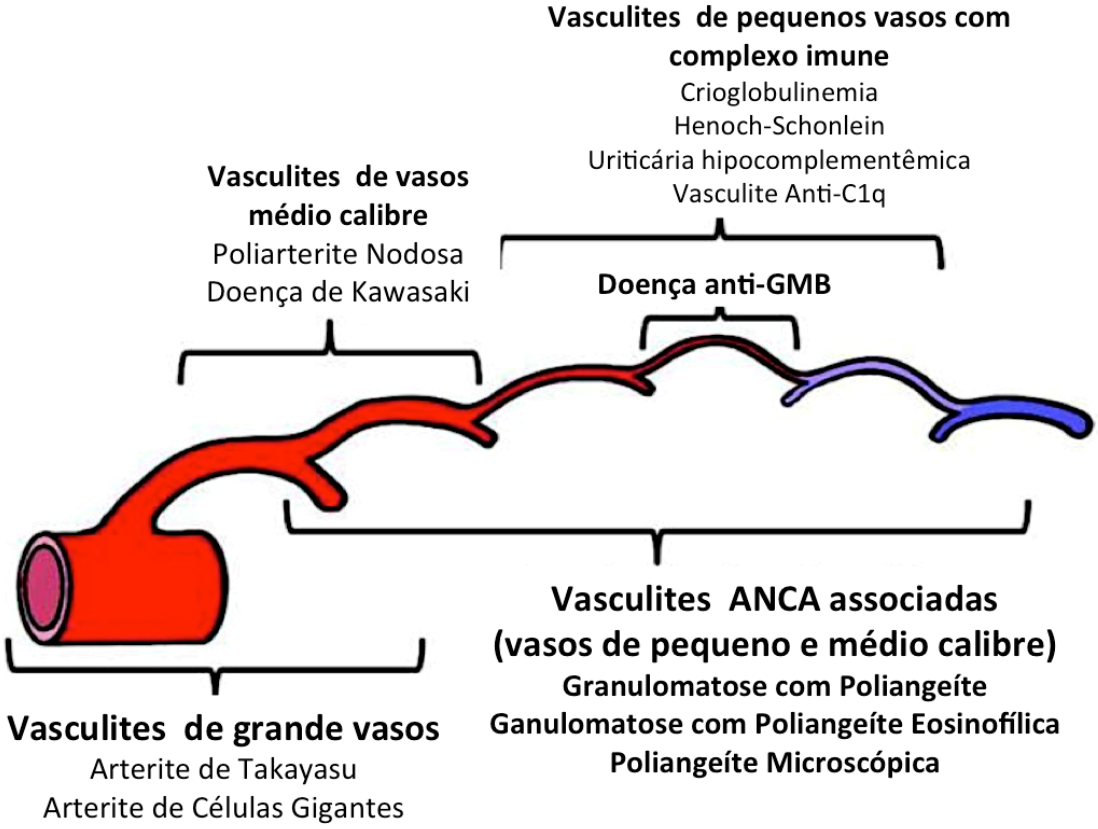
5.3 Resultados dos objetivos primários 40
5.4 Resultados dos objetivos secundários 41
5.4.1 Relação HLA e ANCA 41
5.4.2 Relação HLA e manifestações clínicas 44
5.4.3 Associação alélica 45
6 Discussão 47
6.1 Análise de outros possíveis alelos associados à GPA 50
6.2 Associação da positividade do ANCA e região HLA 51
6.3 HLA e manifestações clínicas 52
6.4 Interdependência dos alelos da região HLA 55
6.5 Limitações do estudo 56
7 Conclusão 57
8 Referências 59
9 Anexos 66
Anexo A 68
Anexo B 73
Anexo C 75
Anexo D 76
Anexo E 82
Anexo F 83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição

Granulomatose com poliangeíte (GPA), anteriormente conhecida como Granulomatose de Wegener, faz parte do grupo das vasculites anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) associadas (VAA), juntamente com a Granulomatose com poliangeíte eosinofílica (GPAE, previamente, Síndrome de Churg-Strauss) e a Poliarterite microscópica (PAM) (Figura 1).[1]

Figura 1 – Classificação das vasculites

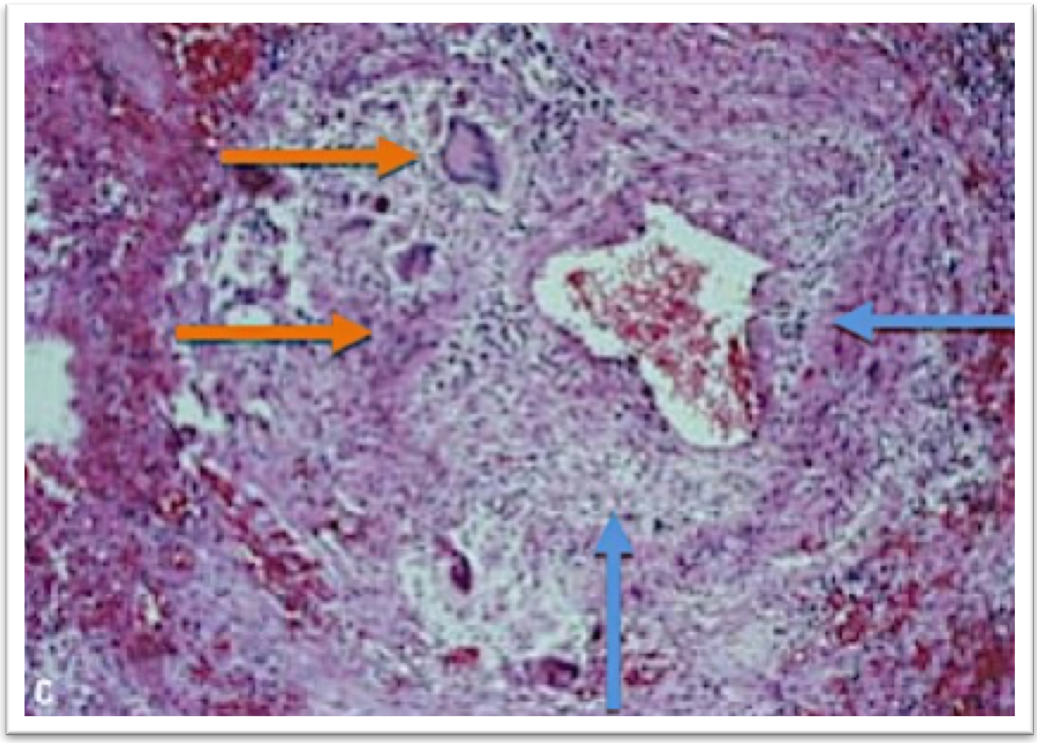


Fonte: Jennete; Artritis Rheum, 65 (1):1-11. 2013

(Permissão dos autores: licença 3839351492249).

A GPA é uma vasculite sistêmica que acomete principalmente vasos de pequeno e médio calibres, causando inflamação com formação de granulomas e necrose (Figura 2).[2, 3]

Figura 2 – Histologia. Infiltrado inflamatório na parede de um vaso de pequeno calibre (setas azuis), granulomas com células gigantes (setas laranjas).



Fonte: Adkinson: Middleton's Allergy: Principles and Practice, 7th ed.

1.2 Nova nomenclatura

A primeira descrição de GPA na literatura médica ocorreu no final do século 19 com o relato de três casos clínicos pelo Dr. Friedrich Wegener[4-6]. A partir dessa data, a doença recebeu o seu homônimo, até que em 2011 o *American College of Rheumatology* (ACR), a *European League Against Rheumatism* (*EULAR*) e a *American Society of Nephrology* (ASN) recomendaram o uso de uma nomenclatura descritiva baseada na patogênese da doença e não no nome de quem a descreveu, o que ocasionou a mudança de Granulomatose de Wegener para Granulomatose com poliangeíte (GPA).[1]

1.3 Papel do anticorpo anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) na Granulomatose com poliangeíte

A detecção sérica do ANCA é uma das marcas da GPA e outras VAA. ANCA é um autoanticorpo dirigido especificamente contra os antígenos presentes nos grânulos primários dos neutrófilos e monócitos. Os dois principais antígenos são a proteinase 3 (PR3) e a mieloperoxidase (MPO).[7]

A interação entre ANCA e os neutrófilos é responsável pelo início da cascata inflamatória, ocasionando dano tecidual, principalmente no endotélio vascular.[7]

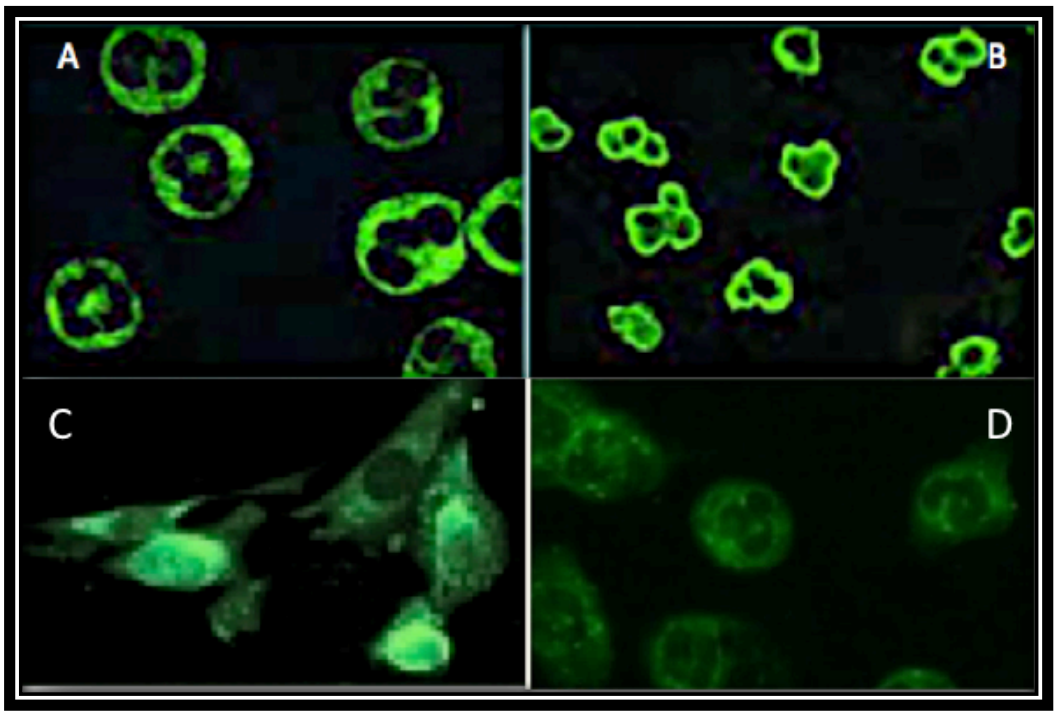
Dois padrões diferentes de ANCA estão associados à GPA e estes podem ser diferenciados por meio do teste de imunofluorescência em ANCA-C (padrão citoplasmático) e ANCA-P (padrão perinuclear)[7] (Figura 6).

O padrão predominante na GPA é o ANCA C (70-80%), e sua confirmação é feita por meio do teste imunoenzimático (ELISA), que demonstra a presença do antígeno proteinase 3 (PR3). O ANCA-P é identificado em uma porcentagem muito menor de pacientes com GPA (10%), e o antígeno reconhecido no teste de ELISA é a mieloperoxidase (MPO)[6].

Dados mais recentes sugerem que um terceiro autoanticorpo dirigido contra a proteína 2 de membrana lisossomal (Anti-LAMP-2) seria um novo subtipo de ANCA e poderia estar relacionado com a patogênese da GPA, através do mimetismo molecular (Figura 6).[8, 9]

Um quarto autoanticorpo ainda em estudo, anti-pentraxina-3 (PTX3), parece ser um novo biomarcador promissor no diagnóstico e na detecção de atividade das VAA, incluindo pacientes ANCA negativo (Figura 6).[10]

Figura 3 – (A) Anticorpo anticitoplasma de neutrófilo padrão citoplasmático (ANCA C), (B) anticorpo anticitoplasma de neutrófilos perinuclear (ANCA P) visualizado através de imunofluorescência, (C) Anticorpo anti-LAMP II e (D) Anticorpo anti-pentraxin-3



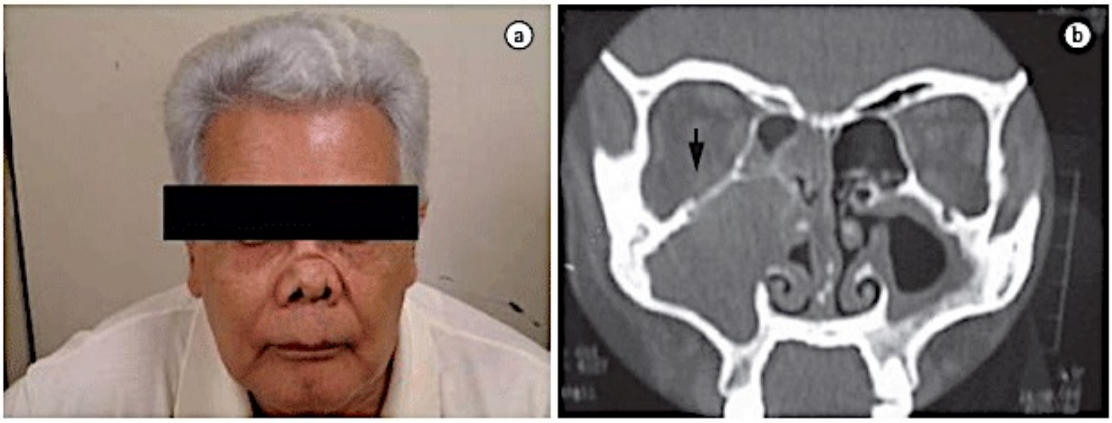
Fonte: J Rheumatology. 2011, J Am Soc Nephrol. 2012, PLoS One. 2016.

1.4 Manifestações Clínicas da Granulomatose com poliangeíte

Dentre as vasculites sistêmicas, a GPA desperta um grande interesse entre os pneumologistas, uma vez que as manifestações pulmonares ocorrem como apresentação inicial em 45% dos casos, e 85% dos pacientes terão algum tipo de acometimento pulmonar no decorrer de dois anos após o início da doença. Os sintomas respiratórios mais frequentes vão desde tosse e dispneia até episódios graves de hemoptise, que podem evoluir para hemorragia alveolar, insuficiência respiratória e óbito.[7]

Por tratar-se de uma vasculite sistêmica, as manifestações da GPA não estão restritas aos pulmões, afetando frequentemente vias aéreas superiores com quadros de sinusite e otite crônicas, mastoidite e destruição de septo nasal e demais estruturas dos seios da face[7] (Figura 4).

Figura 4 - (A) nariz em sela (destruição de septo nasal pela GPA), (B) Tomografia computadorizada de seios da face com sinusite maxilar bilateral e destruição da parede óssea de seio maxilar direito (seta).



Fonte: Imagens do ambulatório de Vasculites Pulmonares HC/FMUSP/INCOR.

Os rins também são alvos frequentes na GPA, com acometimento de aproximadamente 77 a 85% dos pacientes. [11, 12] Os indivíduos que desenvolvem acometimento renal podem apresentar um quadro de glomerulonefrite com evolução para insuficiência renal terminal nos casos não tratados a tempo.[2, 13, 14]

Outros órgãos menos comumente acometidos são: pele, sistema osteoarticular, olhos, sistema nervoso central e periférico, trato gastrointestinal, coração, tireoide e fígado.[14-19]

1.5 Manifestações radiológicas da Granulomatose com poliangeíte

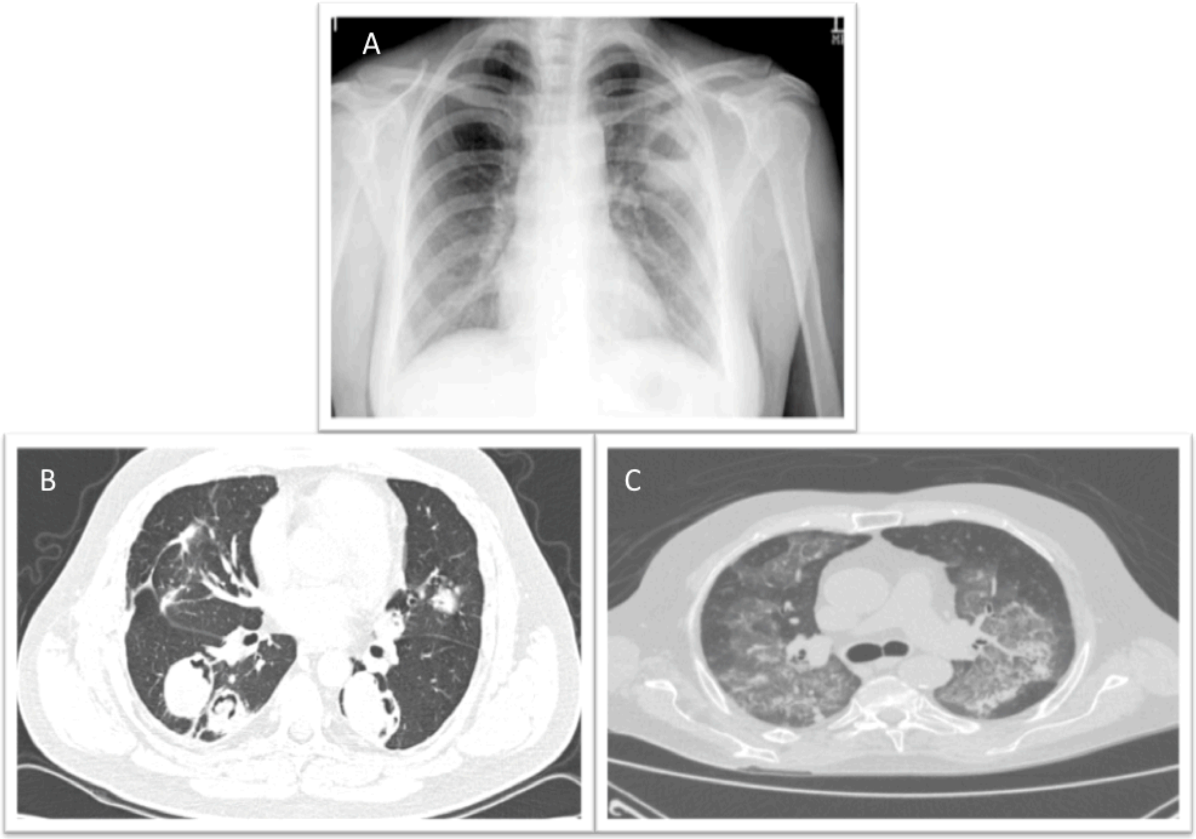
Os exames radiológicos de tórax também mostram alterações frequentes nestes pacientes, com o surgimento de infiltrados pulmonares em vidro fosco (67%); nódulos ou massas bilaterais com ou sem cavitação (58%) (Figura 5).[20]

Outras alterações radiográficas menos frequentes ou pouco características são: estenose subglótica ou brônquica, derrame pleural, massas mediastinais e linfonodomegalias.[20]

A Tomografia computadorizada de tórax com cortes de alta resolução, especialmente com a reconstrução adicional das vias aéreas, e a tomografia por emissão de pósitrons (PET-

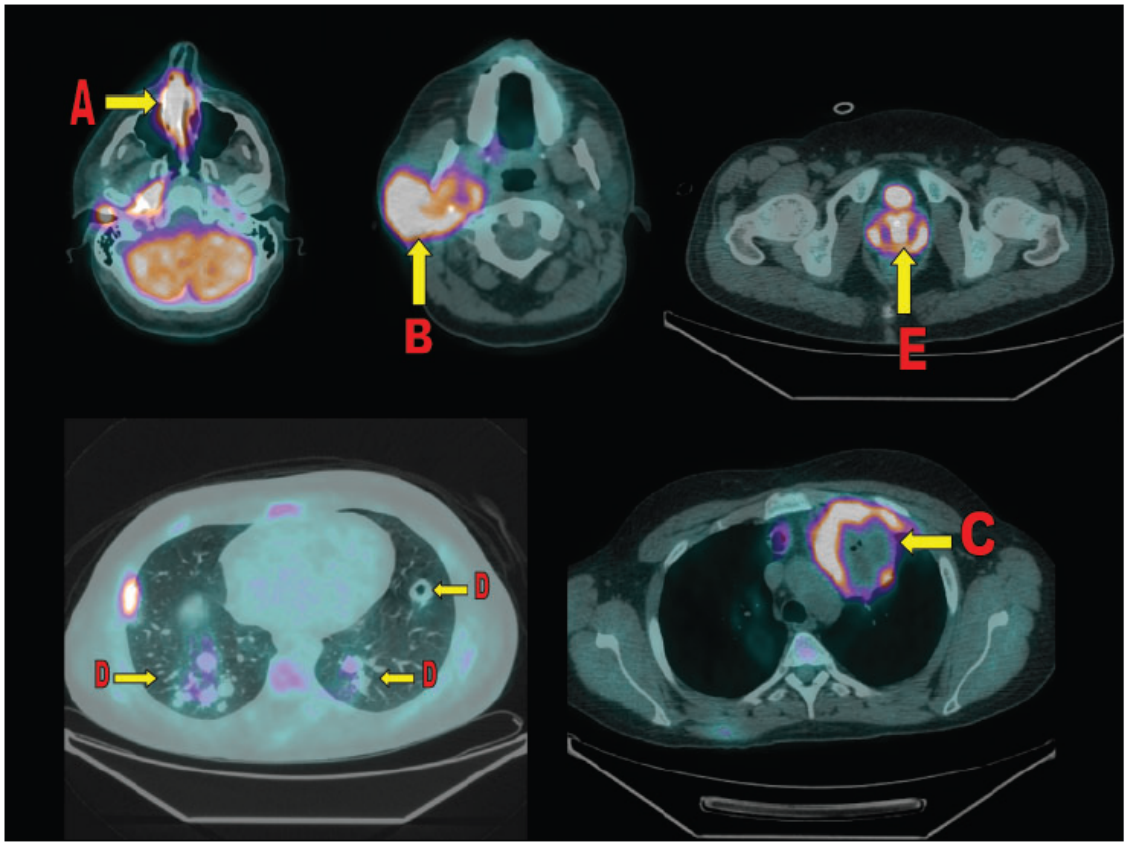
CT) podem auxiliar no detalhamento do acometimento da doença e mesmo para caracterizar sua atividade inflamatória precoce.[21] (Figura 6).

Figura 5 – Radiografia de tórax e tomografia computadorizada de tórax. (A) Radiografia de tórax com massa escavada em lobo pulmonar superior esquerdo. (B) Tomografia computadorizada de tórax com múltiplos nódulos e massas pulmonares escavadas. (C) Tomografia computadorizada de tórax com infiltrado pulmonar bilateral em vidro fosco (hemorragia alveolar).



Fonte: Imagens do ambulatório de vasculites pulmonares HC/FMUSP/INCOR.

Figura 6 – Tomografia por emissão de pósitrons (PET – CT) mostrando atividade da GPA em várias localizações do organismo. (A) cavidade nasal; (B) parótida direita; (C) massa mediastinal anterior; (D) múltiplos nódulos pulmonares escavados; (E) inflamação prostática[21]



Fonte: Almuhaideb A, Br J Radiol. 2011.

1.6 Diagnóstico da Granulomatose com poliangeíte

O diagnóstico da GPA é feito após verificação de quadro clínico, laboratorial e radiológico compatíveis com a doença. De acordo com o Colégio Americano de Reumatologia (ACR), para o diagnóstico da GPA o paciente deve apresentar pelo menos dois dos seguintes critérios: inflamação nasal ou oral; nódulos, infiltrados fixos; ou cavitações na radiografia de tórax; hematúria microscópica ou mais de cinco eritrócitos por campo de grande aumento e biópsia do local acometido pela doença compatível com GPA.[7] Mais

recentemente, a descrição do ANCA, especialmente o ANCA C e sua associação com a GPA, auxiliou na suspeita e confirmação do diagnóstico da doença.[7]

A ausência do ANCA, associado a um quadro clínico sugestivo, não exclui o diagnóstico, devendo ser solicitada uma biópsia de tecido pulmonar, gengiva, septo nasal, pele e até renal, de acordo com a manifestação clínica da doença. O exame anatomopatológico deve mostrar a presença de inflamação na parede do vaso com necrose (vasculite necrosante) e a presença de células gigantes em suas proximidades. Em nosso meio é mandatória a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes e fungos para a exclusão de doenças infecciosas granulomatosas. A análise detalhada do anatomopatológico deve ser realizada para o diagnóstico diferencial com outros processos granulomatosos. Nosso grupo de estudo em vasculites da FMUSP demonstrou que o achado de destruição da lâmina elástica das artérias de médio e pequeno calibre, presença de apoptose no endotélio desses vasos e a trombose intra-arterial são características da GPA.[22-24]

1.7 Terapêutica e prognóstico da Granulomatose com poliangeíte

A terapêutica da GPA consiste inicialmente na administração de drogas que irão induzir a remissão da doença (fase de indução) geralmente por um período de 3 a 6 meses. Depois de atingida a remissão (controle dos sintomas, melhora do quadro radiológico e negativação do ANCA), inicia-se a fase de manutenção da remissão, que deverá perdurar por pelo menos um ano e poderá ser feita com a mesma droga utilizada na indução ou por droga imunossupressora com menos efeitos colaterais. Os medicamentos e o tempo de tratamento poderão variar de acordo com a gravidade e o grau de atividade da doença[25].

A indução deverá ser feita com ciclofosfamida e/ou rituximab, nos pacientes com creatinina acima de 1,7 mg/dl, associado a corticosteroides (prednisona 1 mg/kg/dia)[25]. Nos casos de hemorragia alveolar ou insuficiência renal rapidamente progressiva (creatinina > 5,7 mg/dl), deverá ser administrado pulso de metilprednisolona (500-1000 mg por dia, durante 3 a 5 dias), associado à ciclofosfamida ou rituximab e plasmaférese.[25, 26]

Nos pacientes com creatinina < 1,7 e quadro clínico estável, a indução poderá ser realizada com metotrexato (15-25 mg/semana) e prednisona (1 mg/kg/dia). Após estabilização da doença, inicia-se a fase de manutenção, na qual os corticoides deverão ser progressivamente

diminuídos até sua retirada total, em um prazo de aproximadamente 6 meses, observando-se o quadro clínico, as manifestações radiológicas e a titulação do ANCA sérico. Já os imunossupressores deverão ser mantidos por até um ano após a remissão, e suas doses, ajustadas com o intuito de conseguir a ausência de sinais da doença, a retirada dos corticoides e a negativação do ANCA sérico. Nos casos que apresentarem remissão completa, a troca por azatioprina tem se mostrado eficaz, com menores efeitos colaterais. No entanto, nos casos refratários, doses mais elevadas de ciclofosfamida e/ou troca por rituximab deve ser realizada.[25]

Após a descoberta das terapias imunossupressoras, a altíssima letalidade da GPA sofreu uma drástica queda, resultando atualmente na sobrevida em cinco anos de 70 a 90%, transformando uma doença agudamente letal em uma doença crônica recorrente.[26, 27]

O acompanhamento clínico, radiológico e laboratorial frequente e judicioso do paciente é fundamental para sua boa evolução.

O diagnóstico das recidivas, efeitos colaterais das medicações e possíveis infecções associadas à imunossupressão devem ser realizados e corrigidos rapidamente para diminuição da morbimortalidade destes pacientes potencialmente graves.[7, 26]

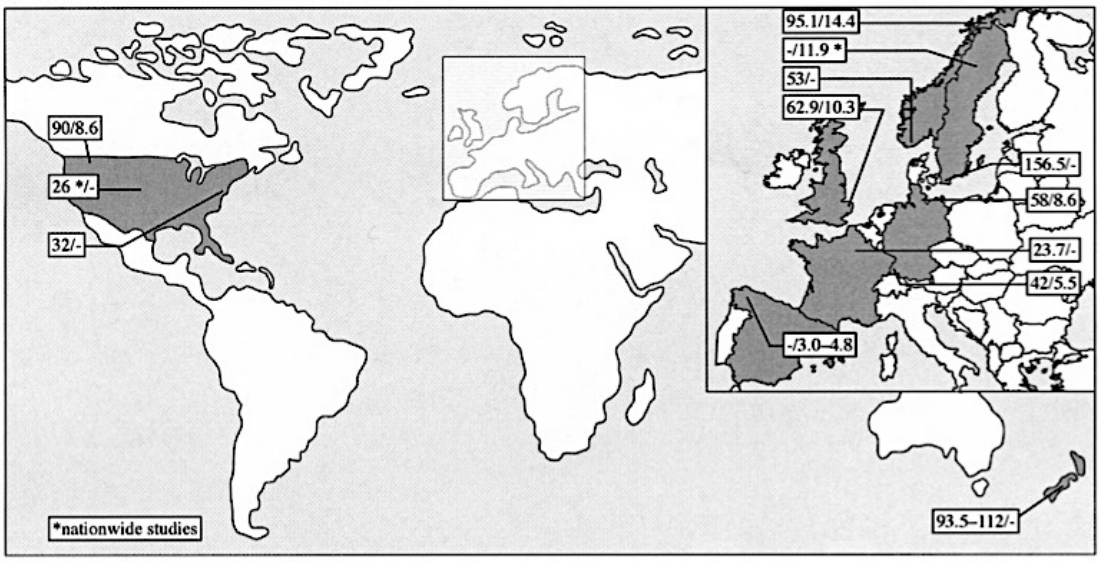
1.8 Epidemiologia e expressão fenotípica da Granulomatose com poliangeíte

- Epidemiologia: Os estudos epidemiológicos sobre GPA apresentaram um enorme avanço nos últimos 20 anos, principalmente após a padronização da definição pela ACR e o CHCC (*Chapel Hill Consensus Conference*) para as diferentes vasculites sistêmicas primárias, o que possibilitou uma melhor separação entre a GPA e demais VAA.[28-30]

Atualmente, sabe-se que a patogênese da GPA é multifatorial, resultante da uma interação entre fatores genéticos e ambientais. Esta diversidade de fatores patogênicos é responsável pela heterogeneidade fenotípica e epidemiológica entre diferentes etnias.[28] Estudos epidemiológicos realizados em países europeus confirmaram essa heterogeneidade, com a constatação de uma menor incidência e prevalência da GPA no sul da Europa, quando comparada com a região norte[28].

A prevalência de GPA varia de 23 a 156 por milhão, e as taxas de incidência, de 3 a 14 por milhão/ano, nos diferentes países europeus.[28-31] (Figura 7).

Figura 7 – Distribuição geográfica da GPA: números representam taxas anuais de prevalência de incidência por milhão.



Fonte: Mahr, A.D. Clin Exp Rheumatol, 2006.

Dados epidemiológicos também indicam uma menor incidência em indivíduos não caucasianos, e não ocorre predileção por sexo. [7]

Embora possa acometer indivíduos de qualquer faixa etária, os pacientes mais frequentemente acometidos estão na quinta década de vida.[11, 14, 32]

- Fenótipos da Granulomatose com poliangeíte: As características fenotípicas descritas na literatura sobre pacientes com GPA são baseadas em populações do hemisfério norte. Existe apenas um estudo pioneiro brasileiro demonstrando o perfil epidemiológico de 134 indivíduos portadores de GPA no hemisfério sul, o qual encontrou características clínicas e laboratoriais semelhantes às descritas em pacientes do hemisfério norte.[33] Curiosamente, essa semelhança fenotípica não foi observada na população japonesa, a qual demonstrou uma menor incidência de manifestações neurológicas e renais, acompanhada pela menor incidência de ANCA C (PR3) quando comparada com a população inglesa.[34, 35]

Isso reflete as bases genéticas e ambientais diferentes entre essas duas populações, gerando diferentes fenótipos de uma mesma síndrome clínica.[34, 35]

1.9 Etiologia e fatores de risco da Granulomatose com poliangeíte

Os eventos responsáveis pela patogênese da Granulomatose com poliangeíte não são totalmente conhecidos, porém acredita-se em uma etiologia complexa e multifatorial, desencadeada pela associação de agentes infecciosos, fatores ambientais e medicamentosos em um indivíduo geneticamente predisposto a desenvolver autoanticorpos específicos, neste caso, o ANCA.[36]

- **Fatores de risco infecciosos:** Dados limitados demonstram que a colonização nasal pelo *Staphylococcus aureus* em indivíduos com GPA é fator de risco para a exacerbação da doença, porém não há relatos que esta mesma bactéria seja um fator causal de GPA. Demais agentes infeciosos investigados incluem outros tipos de bactérias, vírus, micobactérias e fungos.[6, 37, 38]

- **Fatores de risco ambientais:** Indivíduos com exposição ao pó de sílica têm demonstrado maior incidência de VAA, assim como a exposição a determinados metais, tais como o mercúrio e o chumbo.[39-41]

- **Fatores de risco medicamentosos:** Os medicamentos que já foram relacionados com a positivação do ANCA e início dos sintomas de GPA são: rifampicina, alopurinol, hidralazina, propiltiouracil, aminoguanidina.[42]

- **Fatores de risco relacionados com a deficiência de alfa-1 antitripsina (AAT):** Acredita-se que os indivíduos com deficiência de alfa-1 antitripsina apresentam um maior risco de desenvolver GPA, pois a alfa-1 antitripsina é a principal inibidora da PR3 *in vivo*. A falta da inibição da PR3 pela AAT gera um desequilíbrio entre protease e antiprotease, resultando em estímulo pró-inflamatório e possibilidade de desenvolvimento da GPA.[43-45]

- **Fatores genéticos relacionados à Granulomatose com poliangeíte:** Para melhorar a compreensão da doença, o componente genético tem sido extensivamente estudado, após

evidências da existência de associação da GPA entre familiares e pela grande diferença de incidência da doença, encontrada entre diferentes etnias.[26] Nos estudos genéticos em GPA, encontramos genes relacionados com a doença, dentro e fora da região HLA.[46-48]

1.10 Terminologias genéticas

- **Gene:** Unidade fundamental da hereditariedade, é definido como uma sequência específica de DNA, que apresenta a mesma função molecular específica.[49]

- ***Lócus*:** (do latim, "lugar"; no plural *loci*) é o local fixo em um cromossomo onde se encontra determinado gene ou marcador genético.[50]

- **Alelo:** Uma das diferentes formas de um gene se apresentar em um *lócus* cromossômico, cada indivíduo é portador de um par de alelos, um herdado da mãe e outro do pai.[51]

- **Polimorfismo:** Existência de duas ou mais formas alternativas de um gene que estejam presentes em frequências estáveis numa população.[51]

1.11 Genética na Granulomatose com poliangeíte

A Granulomatose com poliangeíte possui uma base genética complexa, por apresentar alterações em múltiplos genes simultaneamente.[28, 52-55] O completo entendimento da genética na GPA é dificultado por sua complexidade, somada a baixa incidência da doença, raridade entre familiares e sua diversidade fenotípica.[48]

Atualmente, a melhor ferramenta utilizada para elucidar a base genética da GPA é o estudo de associação genômica ampla (GWAS), o qual utiliza a técnica de microarranjo (*microarray)*, com capacidade de avaliar milhares de genes ao mesmo tempo.[56]

Com o uso dessa tecnologia, estudos recentes têm sido capazes de reunir um número significativo de pacientes em diversos centros mundiais, contribuindo enormemente para a compreensão atual da genética da GPA em diferentes etnias.[57]

Até o momento, a associação genética mais convincente na GPA é representada pela região HLA, com destaque para o alelo DPB1*0401, encontrado nas diferentes populações estudadas.[46]

Fora da região HLA, os genes SERPINA1 e PRTN3 também apresentaram associação com GPA. Outras associações genéticas como PTPN22, CTLA4, SEMA6A ainda requerem melhor confirmação.[52, 56, 58]

1.12 Complexo principal de histocompatibilidade e nomenclatura

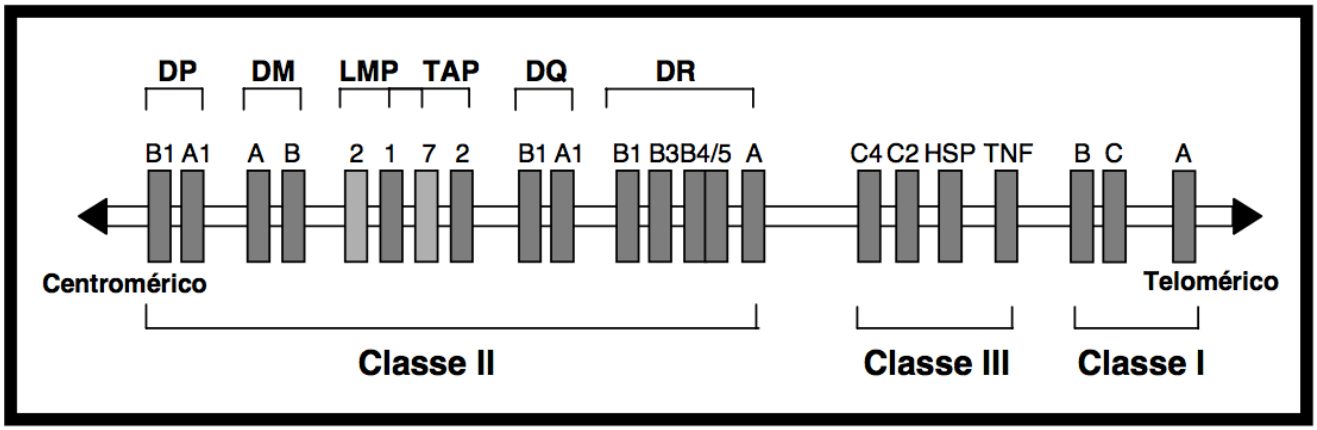
Os genes de histocompatibilidade são assim chamados porque, quando descobertos, foram relacionados à rápida rejeição de tecidos transplantados entre camundongos de experimentação, sendo em conjunto denominados Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*).[51]

Os genes do complexo MHC na espécie humana recebem a denominação de sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*).

A região HLA contém mais de 250 genes e aproximadamente 40 deles estão relacionados ao reconhecimento de um enxerto como semelhante ou diferente do tecido do hospedeiro (*self* e não-*self).* [51]

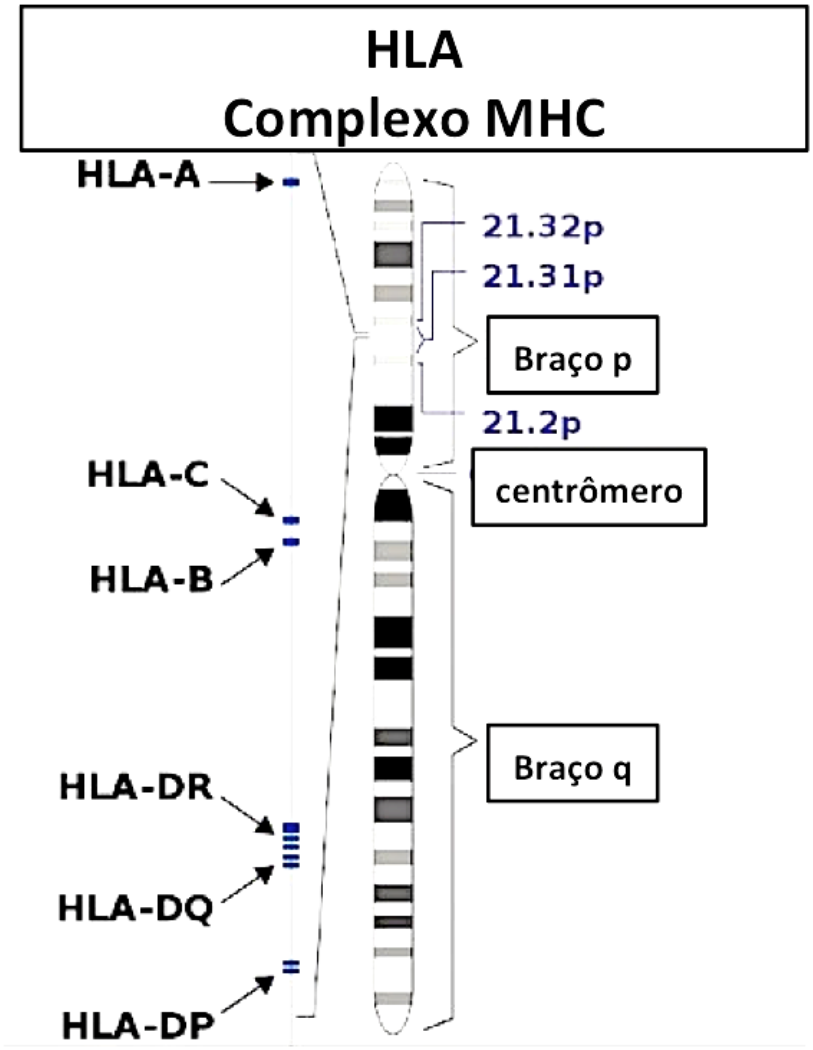
A função dos genes HLA é codificar proteínas, que atuam no reconhecimento e na apresentação de antígenos estranhos. Esses genes são agrupados em três regiões, classes I, II e III, de acordo com as suas localizações no braço curto do cromossomo 6. Essas três regiões contêm a maior taxa de polimorfismo do genoma humano.[51] (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), no braço curto do cromossomo 6. Os genes de classe I (*loci* HLA-A, B e C) estão situados mais telomericamente. Os genes clássicos de histocompatibilidade de classe II HLA-DR, DQ, DP estão situados mais centromericamente. Os genes de classe III, embora situados dentro do CPH, não codificam moléculas de histocompatibilidade.



Fonte: Donadi E.A, Simpósio associação do sistema HLA com doenças no Brasil. FMRP/USP. jan. 2000.

Figura 9 – Mapa do cromossomo 6 humano, incluindo genes HLA classes I e II.



Fonte: Modificado de Kontakioti E et al. Human Immunol 2014.

A região de classe I engloba os *loci* HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L. Porém, apenas os genes HLA A, B e C são responsáveis por codificar as moléculas clássicas de histocompatibilidade.[50]

Na região de classe II, os genes HLA-DR, DQ e DP são os responsáveis pela produção das moléculas clássicas de histocompatibilidade e estão envolvidas na rejeição contra enxertos.[49]

A nomenclatura dos *loci* de classe II consiste em três letras: a primeira indica a classe (D), a segunda a família (P, Q ou R) e a terceira a cadeia (A ou B). HLA-DRB, por exemplo, se refere a genes classe II da família R codificando cadeias Beta.[50] Os genes individuais são diferenciados por algarismos arábicos, e suas numerosas variantes alélicas são representadas por um número precedido por um asterisco. Por exemplo, HLA-DRB1*04:01 se refere à variante alélica 04:01 do gene 1, o qual codifica a cadeia B de uma molécula classe II pertencente à família R.[50]

A região de classe III não está relacionada com as moléculas clássicas de histocompatibilidade.[50]

Os genes HLA são codominantes; isso significa que há expressão tanto dos genes de origem materna quanto paterna.[50]

1.13 Expressão das moléculas MHC e apresentação antigênica

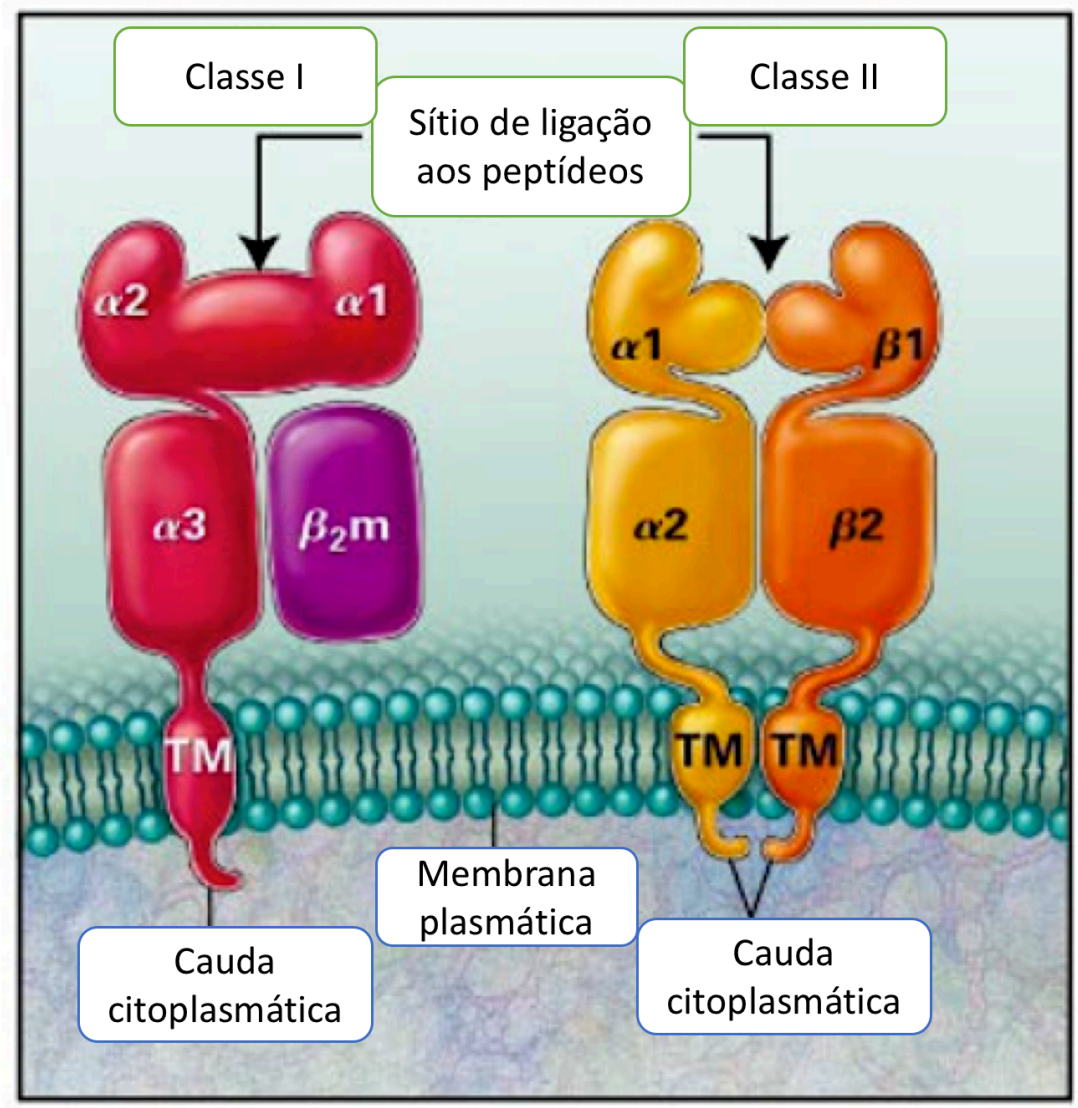
Os genes de classe I são expressos pela maioria das células somáticas, embora a expressão varie de acordo com o tecido. Em contraste, os genes de classe II são expressos apenas por um subgrupo de células do sistema imunológico, incluindo linfócitos B, linfócitos T ativados, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais do timo. A função de ambas as moléculas classes I e II é a apresentação de pequenos peptídeos derivados de patógenos para os linfócitos T, um processo que inicia a resposta imune adaptativa.[60]

Os linfócitos T reconhecem antígenos "estranhos" através de seu receptor de célula T (TCR), na forma de pequenos peptídeos processados e apresentados pelas células que possuem antígenos (APCs), no contexto do MCH-I ou MHC-II. Os antígenos intracelulares são apresentados às células T por células nucleadas juntamente com moléculas de MHC-I. Por outro lado, os antígenos exógenos são capturados pelas APCs, que processam os antígenos e os apresentam no contexto do MHC-II.[60-61]

Os peptídeos associados ao MHC-I são produzidos pela degradação de proteínas citosólicas, que tipicamente geram peptídeos de 4 a 20 aminoácidos. Estes peptídeos antigênicos são transportados para o retículo endoplasmático, onde uma nova molécula de MHC-I também está sendo sintetizada. Um peptídeo, então, se une à fenda da molécula do MHC-I, e este complexo peptídeo-MCH-I é recrutado para a superfície celular.[61]

Os antígenos exógenos são gerados a partir da degradação das proteínas que sofrem endocitose. Essas proteínas são clivadas por proteases no ambiente ácido da vesícula endocítica, e as moléculas de MHC-II se associam aos peptídeos, formando um complexo peptídeo-MHC-II estável e, então, são recrutados para a superfície celular.[61]

Figura 10 – Estrutura das moléculas de HLA classe I e classe II. β 2-microglobulina (β 2m) é a cadeia leve da molécula de classe I. A cadeia da molécula de classe I tem dois domínios de ligação a peptídeos: 1α e 2α, um domínio semelhante à imunoglobulina 3α, a região transmembrana (TM), e a cauda citoplasmática. Cada uma das cadeias de classe II tem quatro domínios: o sítio de ligação a peptídeos (α1 ou β1), o domínio semelhante à imunoglobulina (α2 ou β2), a região transmembrana (TM) e a cauda citoplasmática.



Fonte: Klein e Sato, 2000.

1.14 Associações entre HLA e GPA

Nos últimos 50 anos, numerosas associações entre a região HLA e várias doenças autoimunes foram demonstradas. A associação entre HLA e VAA tem sido amplamente investigada, para diferentes populações e com vários métodos. No entanto, o pequeno número de pacientes com diagnóstico de VAA ao redor do mundo tem limitado uma pesquisa mais ampla e complexa sobre o assunto.[62, 63]

A GPA é a VAA mais estudada, apresentando evidências do envolvimento de múltiplos genes situados na região HLA.[62, 63] A primeira associação significativa entre os alelos da região HLA e a GPA foi identificada no ano de 2004, em um estudo caso-controle com 150 alemães portadores de GPA e ANCA C positivo. Esse estudo investigou uma relação entre a doença e os genes ligados à apoptose, descobrindo uma forte associação com o alelo DPB1*0401e a GPA, OR 3,95[46]. Curiosamente, esse alelo havia sido previamente relacionado a Beriliose, outra doença granulomatosa.[64]

Passados quatro anos, esses resultados foram confirmados em outro estudo com 282 pacientes alemães, revelando novamente uma importante associação de GPA com o alelo DPB1*0401, porém, essa relação ocorreu predominantemente no subgrupo de pacientes com GPA e ANCA C positivo (OR 3,38), enquanto que o subgrupo formado por indivíduos com GPA e ANCA C negativo não demonstrou associação com o alelo.[65] Hoje, sabe-se que a região DPB1*0401 constitui a mais sólida associação genética com a GPA, em especial nos pacientes com ANCA C positivo.[56]

Posteriormente, um grande estudo norte americano reuniu 459 indivíduos com GPA (americanos e canadenses) que confirmou e ampliou os resultados dos estudos prévios, demonstrando uma associação de todo o *lócus* DPB1*04, incluindo não só o alelo 0401, mas também o 0402 ($p=1,92 \times 10^{-50}$). Esse estudo também demonstrou a associação de *lócus* vizinho, o DPA1 ($p=2,18 \times 10^{-39}$) com a GPA.[66] Ainda nesse estudo, a análise de subgrupos das regiões DPB1 e DPA1 revelou que todas as associações foram restritas ao grupo ANCA C positivo. Este achado corrobora com as evidências do estudo anterior, que demonstra uma diferença genética entre pacientes com GPA ANCA C positivos e negativos. [66, 67]

Nesse mesmo contexto, um estudo com indivíduos chineses, demonstrou mais uma vez a importância do *lócus* DPB1 nas VAA, por revelar que o alelo DPB1*0402 pode representar um marcador independente de mortalidade nestes indivíduos.[68]

Um recente estudo da região HLA com 1.233 ingleses portadores de VAA ajudou a elucidar se a Granulomatose com poliangeíte e a Poliangeíte Microscópica representam doenças distintas ou se fazem parte de espectros diferentes de uma mesma doença.[69-72] Esse estudo encontrou diferenças significantes no HLA entre as duas doenças somente quando os indivíduos com GPA apresentavam ANCA C positivo, e os com PAM apresentavam ANCA P.[72.] O *lócus* DP foi mais uma vez relacionado com indivíduos portadores de GPA e ANCA C positivo ($p=6,2 \times 10^{-89}$), enquanto que os pacientes portadores de PAM e ANCA P positivo demonstraram associação com o *lócus* DQ ($p=2,1 \times 10^{-08}$).[72] Os resultados sugerem que as diferenças genéticas estão mais relacionadas com a presença ou ausência dos autoanticorpos (ANCA C ou P) do que com as síndromes clínicas *per se*.[72]

Outro estudo europeu com VAA, que analisou predominantemente pacientes holandeses portadores de GPA, demonstrou uma associação de risco para VAA com o alelo DRB1*04 e uma associação de proteção contra VAA nos portadores do alelo DRB1*13.[48]

Há ainda um pequeno estudo com indivíduos afro-americanos portadores de GPA e ANCA C positivo (PR3) que, curiosamente, demonstrou uma enorme associação com um diferente gene da região HLA classe II, o alelo DRB1*15 (OR 73).[47]

Em resumo, os estudos populacionais de pacientes com GPA demonstraram que existem diferenças nos alelos mais prevalentes entre as várias populações e etnias. Essa diferença ganha maior impacto no subgrupo de pacientes portadores de ANCA C positivo. Os principais alelos da região HLA associados à GPA nas seis populações estudadas até hoje estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Alelos HLA classe II associados à GPA nas diferentes populações do mundo.

Gene	População	Casos	Controle	OR	Valor -p	ref.
DPB1*0401	Alemanha	150 GPA ANCA C+	100	3,95	$1,51x10^{-10}$	(46)
DPB1*0401	Alemanha	282 GPA	380	3,01	$2,3x10^{-21}$	(65)
DPB1*0401	Alemanha	252 GPA ANCA C+	380	3,38	$1,2x10^{-22}$	(65)
DR4	Holanda	241 GPA	5872	1,7	$1,0x10^{-4}$	(48)
DRB1*15	Afro--americanos	16 ANCA PR3	106	73	$2,3x10^{-9}$	(47)
HLA-DP	Inglaterra	1683 GPA	6858	5,39	$3,1x10^{-85}$	(72)
HLA-DQ	Inglaterra	1683 GPA	6858	0,83	$2,2x10^{-6}$	(72)
HLA-DP	Inglaterra	1521 GPA ANCA C+	6858	7,03	$6,2x10^{-89}$	(72)
DQ	Inglaterra	1521 GPA ANCA C+	6858	0,86	$3,3x10^{-5}$	(72)
DPB1	EUA e Canadá	750 GPA	1820	0,24	$1,92x10^{-50}$	(66)
DPA1	EUA e Canadá	750 GPA	1820	0,3	$2,13x10^{-39}$	(66)
DPB1	EUA e Canadá	578 GPA ANCA C+	1820	0,16	$4,7x10^{-57}$	(66)
DPA1	EUA e Canadá	578 GPA ANCA C+	1820	0,27	$2,3x10^{-42}$	(66)
DRB1*13	Holanda	241	5872	0,3	$1,0 x10^{-42}$	(48)

2. HIPÓTESE

Existe um perfil da região HLA específico em pacientes com GPA na população brasileira como existe nas populações da Europa, América do Norte e Ásia?

Existe interação entre os diversos alelos da região HLA em pacientes com GPA, comparados com indivíduos sadios?

Existe associação entre a região HLA e a positividade do ANCA e as diversas manifestações clínicas?

Existem outros alelos HLA associados à GPA na população brasileira?

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo primário

O objetivo deste estudo foi tipificar os quatro alelos do sistema HLA classe II, DPB1*04, DRB1*15 e DRB1*04 (os que são associados ao aumento de risco para GPA), e o alelo DRB1*13 (associado à proteção contra GPA nas outras etnias estudadas), em pacientes com diagnóstico de GPA atendidos no ambulatório de Vasculites Pulmonares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e compará-los com controles doadores de órgãos sólidos sem doença prévia sabida.

3.2 Objetivo secundários

1. Realizar uma ampla avaliação de 113 outros alelos da região HLA classe I e II nesses mesmos pacientes.
2. Descrever os alelos associados à população estudada e relacioná-los com:
    a) Positividade do ANCA e ANCA C.
    b) Quatro acometimentos sistêmicos mais frequentes da GPA.
3. Avaliar a influência da associação cumulativa entre os alelos estudados nos pacientes com GPA, utilizando o modelo de árvore de decisões.

4. MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

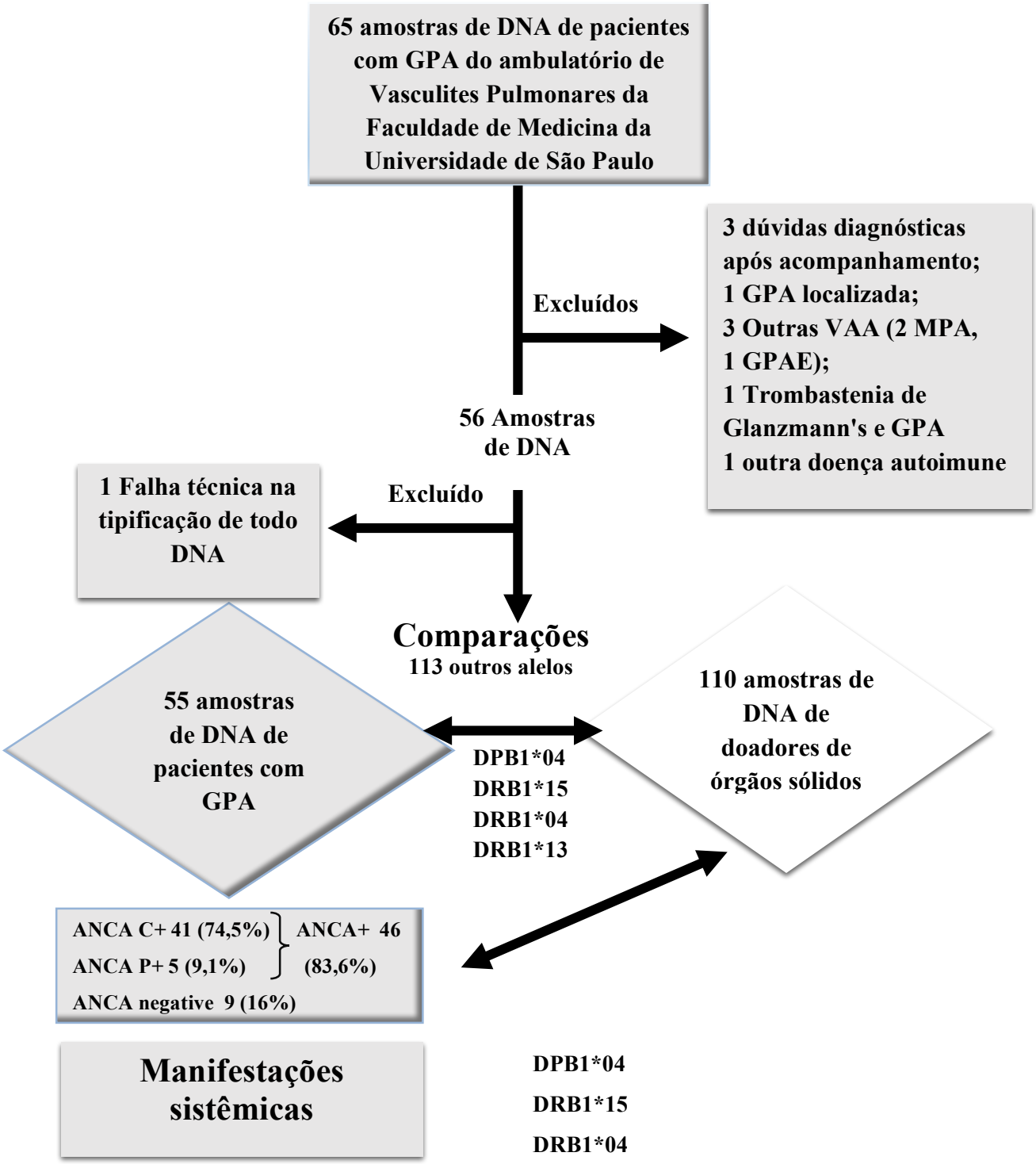
Estudo caso-controle para comparação da frequência dos alelos da região HLA classes I e II em pacientes portadores de GPA com um grupo controle.

Foram estudados os pacientes com diagnóstico de GPA acompanhados no ambulatório de Vasculites Pulmonares A2MP 7800 da Disciplina de Pneumologia HC-FMUSP.

Como controles para cada paciente do grupo GPA, foram utilizadas duas amostras de DNA de diferentes doadores de órgão sólido sem doença prévia sabida, do mesmo sexo e idade, armazenadas no banco de doadores de órgãos sólidos do InCor/HC-FMUSP.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto do Coração (InCor/HC-FMUSP) (CAPPesq 419585, registro *on-line* 9878). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi explicado e aceito por todos os participantes do grupo estudado, enquanto no grupo controle o TCLE não foi exigido, já que foram analisadas amostras de DNA arquivadas no banco de doadores de órgãos sólidos do InCor/HC-FMUSP.

Figura11 – Fluxograma do estudo.



4.2 Grupo de pacientes com GPA

Os indivíduos elegíveis para o estudo foram provenientes do ambulatório de Vasculites Pulmonares da Disciplina de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Instituto do Coração (HC-FMUSP/InCor).

Todos os pacientes foram avaliados pelo autor desta tese quanto a manifestações clínicas, exames laboratoriais, radiológicos e anatomopatológicos relacionados à doença.

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo e somente o fizeram após o entendimento e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. No caso de pacientes com idade inferior a 18 anos, a participação foi condicionada à aprovação dos pais ou responsáveis legais.

Após TCLE, foram coletados 10 mL de amostra de sangue de cada paciente. Essas amostras foram enviadas para armazenamento e posterior tipificação do HLA classes I e II no Laboratório de Imunologia de Transplantes do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados como critérios de inclusão para que o paciente pudesse participar do estudo:

1) Diagnóstico prévio de GPA de acordo com *American College of Rheumatology* (ACR), que inclui o cumprimento de pelo menos dois dos seguintes critérios:

a) Inflamação nasal ou oral;

b) Nódulos, infiltrados fixos, ou cavitações na radiografia de tórax;

c) Hematúria microscópica ou mais de cinco eritrócitos por campo de grande aumento;

d) Inflamação granulomatosa com vasculite necrosante na biópsia do local acometido pela doença.

Foram utilizados como critérios de exclusão para a participação no estudo:

a) Pacientes portadores de outras vasculites (primárias ou secundárias);

b) Diagnóstico de outras doenças autoimunes concomitantes;

c) Presença de outras doenças que pudessem interferir nos critérios diagnósticos ou nos resultados do estudo.

Foram selecionadas para o estudo 65 pacientes que preencheram os critérios de inclusão, os quais compareceram no período de 2010 a 2015 com acompanhamento regular. Destes 65 pacientes avaliados, dez foram excluídos. Três pacientes foram excluídos por dúvida diagnóstica final após o seguimento a médio e longo prazo; um, por apresentar GPA limitada; outros três, por apresentarem outras VAA (2 PAM, 1 GPAE) durante o acompanhamento; uma paciente, por apresentar diagnóstico de Trombastenia de Glanzmann concomitante; mais um paciente, por apresentar outra doença autoimune concomitante; e um último paciente que foi excluído por apresentar falha na tipificação de toda a região HLA, impossibilitando a análise de toda sua amostra.

Em todos os indivíduos foram coletados dados referentes à cor da pele (ou etnia), de acordo com os critérios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em que a própria pessoa se classifica como uma das seguintes categorias: branca, preta, amarela (oriental), parda (mulata, cabocla, mameluca ou mestiça de preto com outra cor ou raça) e indígena.[73]

Ao final, o teste de tipificação da região HLA foi realizado em 55 pacientes com GPA pelo método microarranjos, o qual avalia múltiplos genes ao mesmo tempo.

Devido à tipificação de grande número de alelos simultaneamente, algumas falhas em alelos isolados ocorreram, porém não foi necessário excluir nesse estudo pacientes com erros de tipificação em alelos isolados. A falha de tipificação de um alelo isoladamente no grupo GPA foi considerada após o erro se repetir em uma reanálise da amostra.

Nos 55 pacientes com GPA, as amostras de sangue foram encaminhadas para análise de presença de ANCA C e P, pela técnica de imunofluorescência direta.

Os 55 pacientes foram avaliados quanto às quatro diferentes manifestações clínicas da GPA: 1) Hemorragia alveolar; 2) presença de massas/nódulos com ou sem escavação; 3) manifestação da GPA em seios da face (sinusite com ou sem destruição de seios da face) e 4) insuficiência renal aguda (aumento de creatinina maior que 20% do valor da normalidade, no intervalo de até duas semanas) para associação com os alelos com resultados significantes para aumento de risco da GPA.

4.3 Grupo controle

Os dados do grupo controle foram obtidos a partir de um banco de dados de doadores de órgãos sólidos. Esse banco contém informações sobre sexo e idade, referente a cada doador, os quais tiveram suas amostras de DNA tipificadas e armazenadas no Laboratório de Imunologia de Transplantes do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O grupo foi composto por 110 amostras de DNA de doadores de órgãos sólidos, as quais foram pareadas para idade e sexo com o grupo GPA.

4.4 Metodologia laboratorial

- Extração de DNA: O DNA genômico foi extraído a partir da amostra de sangue coletada com EDTA. As extrações foram realizadas pelo método que utiliza sais de Brometo de Tetrametilamônio (Bignon; Viña, 1995). O sangue foi inicialmente centrifugado por dez minutos a 1.500 rpm. O *buffy-coat* ("papa de leucócitos") foi recuperado e transferido para dois tubos de 2 mL (aproximadamente 500 μL em cada tubo), ao qual foi adicionado igual volume de tampão de lise, DTAB 12% (brometo de dodeciltrimetilamônio). Os tubos foram então homogeneizados e incubados em banho-maria a 68°C por 5 minutos, acrescentou-se 1 mL de clorofórmio e agitou-se os tubos vigorosamente. Após centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm, a camada superior (aquosa), onde estava o DNA, foi recuperada e foi adicionado 1 mL de CTAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio). Essa mistura foi homogeneizada até a obtenção do precipitado DNA/CTAB. Após nova centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm, o *pellet* DNA/CTAB foi suspendido novamente em 300 μL e mais uma vez precipitado em 750 μL de etanol absoluto. Centrifugou-se por mais 2 minutos a 13.000 rpm, e o *pellet* foi novamente suspendido em etanol 70%, para retirar o excesso de sal. O sobrenadante foi, então, desprezado, e o DNA obtido foi dissolvido em H_2O.

A quantidade e a pureza do DNA genômico foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) nos comprimentos de onda de 260 e

280 nm. A razão de λ 260/280 nm variou de 1,7 a 1,9, indicando boa qualidade do DNA. Todas as amostras ficaram estocadas em congelador a - 80°C até o início das tipificações.

- Tipificação HLA: A tipificação HLA dos indivíduos portadores de GPA, assim como a tipificação do HLA C, DQ, DP dos doadores, foram realizadas por PCR-SSO, reação de polimerização em cadeia utilizando oligonucleotídeos de sequência específica (do inglês, *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotides*), servindo-se da tecnologia Luminex. Foram usados os kits LABTypes SSO (One Lambda, Califórnia, EUA), segundo orientação do fabricante.

A tipificação dos *loci* HLA A, B e DR do grupo controle foi realizada pela metodologia PCR-SSP, reação de polimerização em cadeia utilizando a sequência específica de *primers* (do inglês, *Polymerase Chain Reaction-sequence Specific Primers*) e o kit LABType SSP (One Lambda, Califórnia, EUA), seguindo as normas desse fabricante.

Inicialmente, foi realizada a amplificação gênica recorrendo-se a *primers* biotinilados específicos para a região gênica de interesse e a *primers* específicos para amplificação de alelos. O produto de PCR amplificado foi então desnaturado e colocado frente a sondas marcadas (hibridização) conjugadas a microesferas (*beads*), codificadas por fluorescência, que fazem parte do sistema multianalítico Luminex. Cada sonda *bead* foi marcada com uma determinada fluorescência, que possui uma sonda de oligonucleotídeo correspondente a um alelo HLA ou a um grupo de alelos HLA. Após a etapa de hibridização, as sondas que hibridizaram com o DNA foram marcadas com uma solução estreptavidina conjugada com ficoeritrina (SAPE), sendo, então, realizada a leitura da reação. As reações foram lidas no citômetro de fluxo LABScan^{TM} 200 (tecnologia Luminex), que é capaz de reconhecer a fluorescência da *bead* e da SAPE ligada à sonda. Um *laser* para a cor vermelha (λ633 nm) reconhecia a cor da microesfera e outro *laser*, a marcação com SAPE, verde (λ532 nm), determinando a positividade da reação. Os dados gerados pelo aparelho foram analisados no *software* HLA Fusion v. 30 para a determinação da tipificação HLA[(74)].

4.5 Falhas de tipagem em alelos isolados

O teste de microarranjos para a tipificação da região HLA avaliou múltiplos genes ao mesmo tempo, e o uso desse método pode gerar erro de tipificação em alelos isolados. Entretanto, como os outros alelos estavam presentes, não foi necessário excluir o indivíduo do estudo.

Para Alelo DPB1*04, obtivemos duas falhas, totalizando 53 indivíduos testados, enquanto nos alelos DRB1*15 e DRB1*04, houveram três falhas, totalizando 52 indivíduos analisados em cada alelo no grupo GPA.

O erro de tipificação em alelos isolados também ocorreu no grupo controle, porém a reanálise do alelo DPB1*04 foi impossibilitada, pois o kit laboratorial da região DP não estava disponível no Brasil, limitando o número de testes. Para este alelo, o número de erros foi de 22 amostras, enquanto para os alelos DRB1*15 e DRB1*04, que estavam disponíveis no Brasil e puderam ser repetidos, não houve falhas, totalizando 110 amostras em cada alelo.

4.6 Análise estatística

Os alelos DPB1*04, DRB1*15, DRB1*04 e DRB1*13 dos pacientes com GPA foram comparados ao grupo controle usando o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, e a razão de chances (OR) em favor da GPA foi calculada para cada alelo estudado.

Nas análises em que haviam três grupos, as comparações foram realizadas duas a duas, e essas foram corrigidas pelo método de Holm. Todas as análises foram conduzidas no pacote R 3.2.0, e o nível de significância foi fixado em 0,05 para os quatro alelos do objetivo primário. Para comparação dos outros 113 alelos restantes entre o grupo GPA e os controles, foi utilizado também o teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Nessa comparação, o nível de significância de p foi corrigido pelo método de Bonferroni para múltiplas comparações, fixando o novo nível de significância em 0,0004.

Os subgrupos dos pacientes com GPA ANCA positivo P ou C ou negativos foram comparados com todos os alelos da região HLA estudados com o teste exato de Fisher, e OR foi calculado. As quatro mais frequentes manifestações clínicas estudadas foram comparadas com os alelos do objetivo primário, que demonstraram significância.

Posteriormente, um modelo de árvore de decisões usando algoritmo CART foi ajustado para identificar quais alelos estavam associados a cada grupo. A árvore foi podada de modo a minimizar o erro de validação cruzada de dez sub-amostras aleatórias. A qualidade do ajuste foi verificada por meio da matriz de confusão. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi verificado para cada *lócus*.

5. RESULTADOS

5.1 Casuística

Os dados referentes a sexo e idade dos 55 pacientes com GPA e dos 110 controles incluídos no estudo encontram-se detalhados na Tabela 2.

	GPA (n=55) Média	DP	Controle(n =110) Média	DP	Valor p
Idade	52,76	14,36	52,05	13,45	0,733
Sexo	**N**	**%**	**N**	**%**	**Valor p**
Feminino	33	60	66	60	1
Masculino	22	40	44	40	

Tabela 2 – Sexo e idade de pacientes e controles.

A porcentagem de indivíduos de acordo com a cor da pele no grupo GPA apresentou características semelhantes à população brasileira moradora de São Paulo e está representada na Tabela 3. Quanto à cor da pele dos indivíduos do grupo controle, não haviam dados disponíveis por tratar-se de banco de dados de doadores de transplante.

Tabela 3 – Cor da pele dos indivíduos do grupo GPA de acordo com IBGE 2011.

Cor da pele (IBGE)	N	Porcentagem
Branco	28	51%
Negro	2	3,6%
Pardo	24	43%
Oriental	1	1,8%
Índio	0	0

A frequência da positividade dos autoanticorpos (ANCA, ANCA C e ANCA P) nos pacientes do grupo GPA estão listados na Tabela 4.

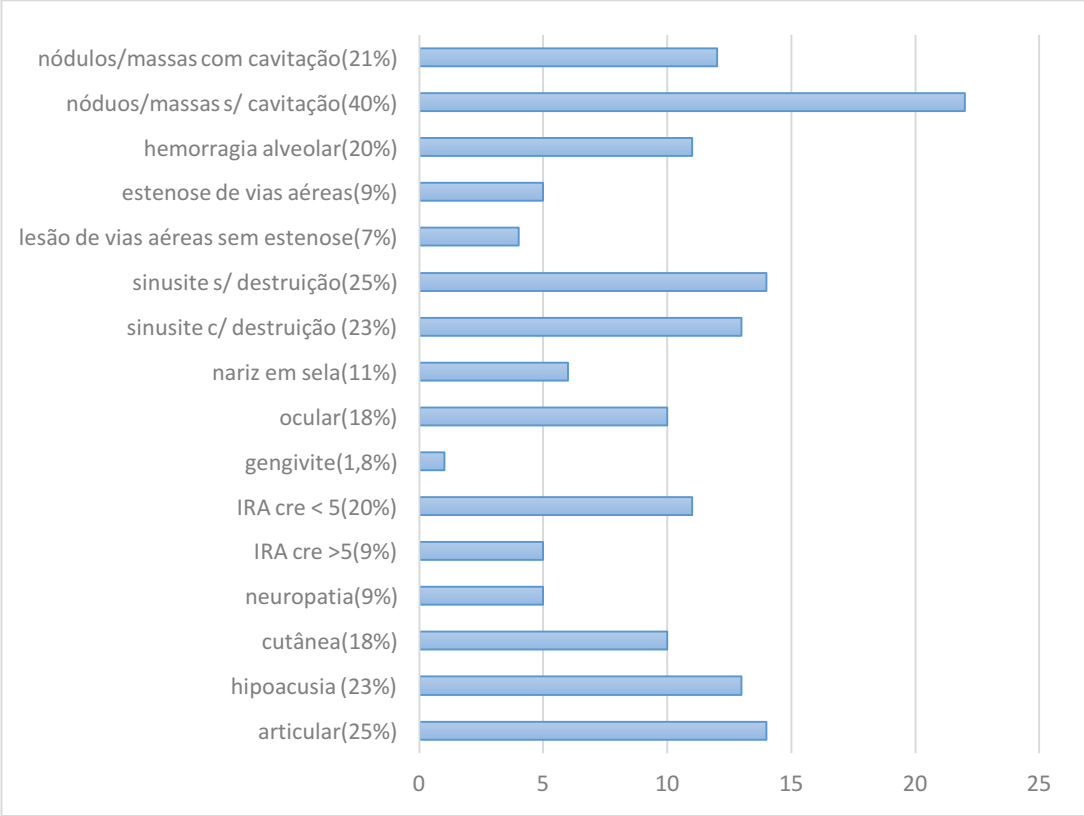
Tabela 4 – Frequência e porcentagem de ANCA, ANCA C e ANCA P nos pacientes do grupo GPA.

Presença de anticorpos	**N**	**Porcentagem**
ANCA	46	83,6%
ANCA C	41	74,5%
ANCA P	5	9,1%
ANCA negativo	9	16%

As manifestações relacionadas à GPA nos diversos órgãos acometidos e suas respectivas prevalências nos indivíduos estudados estão apresentadas detalhadamente no Gráfico 1.

A maioria dos indivíduos apresentava lesões pulmonares, totalizando 45 pacientes afetados (81%); as vias aéreas superiores estavam lesadas em 33 indivíduos (60%) e 17 (31%) apresentaram disfunção renal.

Gráfico 1 – Manifestações clínicas em 55 pacientes com GPA.



5.2 Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

A distribuição dos genótipos nos *loci* A, B, C, DRB1, DQA, DQB, DPA1 e DPB1 não apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para nenhum dos dois grupos. A apresentação completa dos resultados dos testes de EHW encontra-se na Tabela 5 e maiores informações, no anexo B.

Tabela 5 – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

	Valor-p
A	1,000
B	0,979
C	1,000
DRB1	1,000
DQA	0,641
DQB	0,726
DPA1	0,454
DPB1	0,125

5.3 Resultados dos objetivos primários

No *lócus* DP, o alelo DPB1*04 estava presente em 42 dos 53 indivíduos do grupo GPA, além de ter sido encontrado em 50 dos 88 controles, apresentando associação estatística significante com p=0,007 e OR-2,9 (IC95%: 1,09–3,8).

Para o *lócus* DR, o alelo DRB1*15 foi encontrado em 21 dos 52 portadores de GPA e no grupo controle a frequência desse alelo foi de 21 dos 110 controles, com um p=0,006 e OR-2,87 (IC95%: 1,44–4,75). O alelo DRB1*04 não apresentou associação estatisticamente significante: a presença do alelo ocorreu em 25 dos 110 controles e 10 dos 52 do grupo GPA p=0,76.

Quando analisamos o fator protetor do DRB1*13, sete de 52 pacientes do grupo GPA (13,4%) apresentaram o alelo, enquanto no grupo controle, 30 de 100 amostras (27,73%) também apresentaram este alelo p=0,042 e OR-0,42 (IC95% 0,21-0,99) (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação da frequência dos alelos: DPB1*04; DRB1*15; DRB1*04; DRB1*13.

	GPA	%	Controle	%	OR	p	IC95%
DPB1*04	42/53	79,2%	50/88	56,8%	2,9	0,007	1,09-3,8
DRB1*15	21/52	40,38%	21/110	19,09%	2,87	0,006	1,4-4,7
DRB1*04	10/52	19,23%	25/110	22,73%	0,81	0,76	0,4-1,8
DRB1*13	7/52	13,46%	30/110	27,27%	0,41	0,042	0,21-0,99

5.4 Resultados dos objetivos secundários

A correção para múltiplos testes de Bonferroni foi utilizada para a análise de todos os outros 113 alelos estudados que não faziam parte do objetivo primário e estavam localizados na região HLA classe I e II, e o novo valor de p calculado foi 0,0004. Os alelos B*7, C*16, DPA1*02 e DPB1*01 apresentaram $p < 0,05$, porém após a correção de Bonferroni para múltiplas comparações o valor de p=0,0004 não foi atingido (anexo C).

As prevalências fenotípicas dos alelos HLA encontradas nos pacientes com GPA e no grupo controle para os *loci* A, B, C, DR, DQ, DP estão apresentadas respectivamente no anexo C.

5.4.1 Relação HLA e ANCA

As prevalências dos alelos DPB1*04 e DRB1*15 em casos e controles foram estratificadas de acordo com presença de ANCA (C e P) e estão representadas nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

- Pacientes com GPA e ANCA positivo *versus* controle quanto a frequência dos alelos: Na análise dos 46 indivíduos com GPA e ANCA positivo, o alelo DPB1*04 estava presente em 40 pacientes, enquanto no grupo controle o alelo foi detectado em 50 das 88 amostras (p=0,0000105 e OR 5,07).

O alelo DRB1*15 foi encontrado em 18 dos 44 indivíduos do grupo GPA e ANCA e em 21 dos 110 controles (p=0,01 e OR 3,05) (Tabela 7).

Tabela 7 – ANCA positivo *versus* controle.

	GPA e ANCA	**%**	**Controle**	**%**	**p**	**OR (GPA e ANCA)**
DPB1*04	40/46	87%	50/88	56,8%	0,0001	5,07
DRB1*15	18/44	41%	21/110	19,1%	0,013	3,05

- Pacientes com GPA e ANCA C positivo *versus* controle quanto a frequência dos alelos: No subgrupo ANCA C positivo, o alelo DPB1*04 estava presente em 36 dos 41 pacientes e em 50 dos 88 controles (p=0,00059 e OR-5,47).

O alelo DRB1*15 foi encontrado em 15 dos 38 pacientes com GPA e ANCA C positivo, enquanto no grupo controle esse alelo estava presente em 21 das 110 amostras (p=0,015 e OR– 2,7) (Tabela 8).

Tabela 8 – ANCA C positivo *versus* controle.

	GPA e ANCA C	**%**	**Controle**	**%**	**p**	**OR (GPA e ANCA C)**
DPB1*04	36/41	87,8%	50/88	56,8%	0,0005	5,47
DRB1*15	15/38	39,5%	21/110	19,1%	0,015	2,76

- Pacientes com GPA e ANCA, ANCA C positivo *versus* pacientes com GPA ANCA negativo e controles quanto a frequência dos alelos: Não houve diferença estatística nos subgrupos ANCA e ANCA C positivo quando comparados com indivíduos ANCA negativos em relação ao alelo DRB1*15. Já para o *lócus* DPB1*04 houve diferença significante entre os grupos ANCA e ANCA C positivo em relação ao grupo ANCA negativo (*p*=0,002 e p= 0,001, respectivamente (tabelas 9 e 10).

Tabela 9 – Análise de significância entre ANCA positivo x controle, ANCA Negativo x Controle e ANCA Negativo x ANCA Positivo.

	Valor-p (posthoc)		
	ANCA positivo x Controle	**ANCA Negativo x Controle**	**ANCA Negativo x ANCA Positivo**
DPB1*04	0,00001	0,49	0,001
DRB1*15	0,011	1	1

Tabela 10 – Análise de significância entre ANCA C positivo x controle, ANCA C Negativo x Controle e ANCA C Negativo x ANCA C Positivo.

	Valor-p (posthoc)		
	ANCA C Positivo x Controle	**ANCA C Negativo x Controle**	**ANCA C Negativo x ANCA C Positivo**
DPB1*04	0,001	1	0,001
DRB1*15	0,035	0,25	1

O OR para o alelo DPB1*04 foi maior no grupo GPA com ANCA C, e o mesmo não foi observado para o alelo DRB1*15 (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparação de OR entre os 3 grupos.

	OR (*versus* controle)		
	GPA total	**GPA e ANCA**	**GPA e ANCA C**
DPB1*04	2,9	5,07	5,47
DRB1*15	2,8	3,05	2,76

5.4.2 Relação HLA e manifestações clínicas

Quando a população estudada foi estratificada de acordo com as manifestações sistêmicas mais prevalentes, encontramos diferença estatística apenas entre o subgrupo GPA com insuficiência renal aguda (IRA) *versus* grupo GPA sem IRA e somente para o alelo DPB1*04 (p=0,01037) (Tabela 12).

Tabela 12 – Associação DPB1*04 e DRB1*15 com IRA nos indivíduos com GPA.

		IRA				
		Ausente		**Presente**		
		N	**%**	**N**	**%**	**Valor-p**
DPB1*04	53	25/36	69,4%	17/17	100,0%	0,01037
DRB1*15	52	15/36	41,2%	6/16	37,5%	0,804

Dezessete indivíduos apresentavam IRA, e todos eram portadores do alelo DRB1*04 (100%), enquanto dos 36 que evoluíram sem IRA, 25 eram portadores deste mesmo alelo (69,4%), com p=0,01037.

Um indivíduo com IRA apresentou falha de análise para o alelo DRB1*15, totalizando dezesseis pacientes avaliados. Destes, seis eram portadores do alelo (37,5%), e quando

avaliamos os 36 indivíduos que não apresentaram IRA, quinze eram portadores do alelo (41,2%), p=0,804.

As demais manifestações clínicas avaliadas não apresentaram significância estatística para os diferentes alelos avaliados. (Tabelas em anexo D)

5.4.3 Associação alélica

A análise cumulativa da associação dos alelos, utilizando a árvore de associação, demonstrou que 81% dos indivíduos portadores da variante alélica DPB1*0401 em homozigose apresentavam GPA. A ausência do DPB1*0401 ou na sua heterozigose com DPB1*0402 ou na apresentação homozigótica do alelo DPB1*0402, o risco da GPA foi de 52,9%. Na ausência do alelo DPB1*0401 e DPB1*0402 e na presença do alelo DRB1*13, nenhum indivíduo apresentou GPA.

Nos indivíduos que não apresentavam os alelos DPB1*0401, DPB1*0402 e DRB1*13, a região decisiva para a frequência da doença foi o alelo C*2, pois 62,5% dos indivíduos portadores desse alelo apresentavam GPA, enquanto apenas 19,2% dos não portadores de C*2 apresentavam a doença.

Assim, encontramos uma interdependência (ausência/presença) entre os alelos DPB1*0401, DPB1*0402, DRB1*13 e C*2 nos pacientes portadores de Granulomatose com poliangeíte (Gráfico 2).

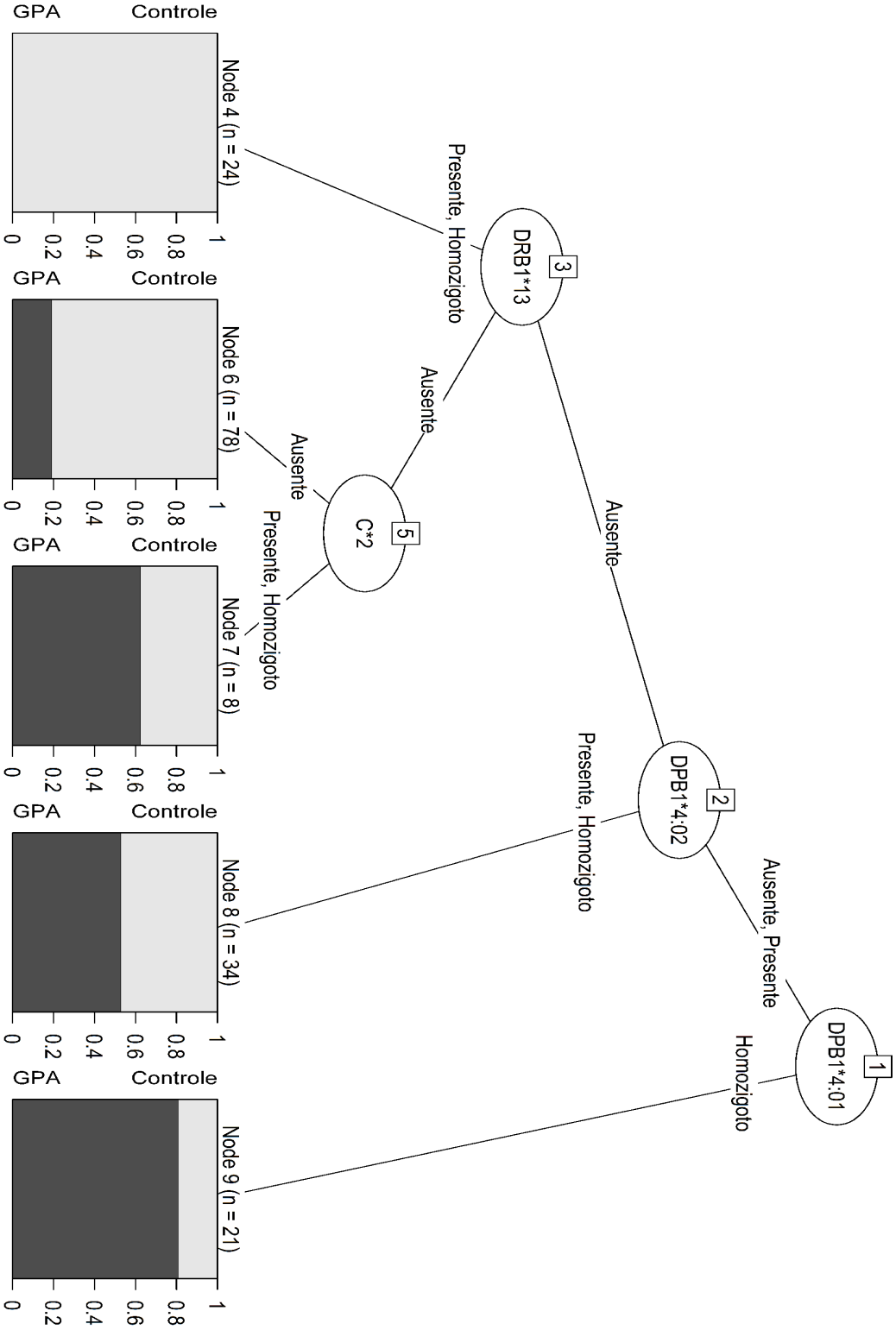


Gráfico 2 - Árvore de decisões

6. DISCUSSÃO

Nossos achados mostram que a base genética da GPA na população brasileira está fortemente associada aos alelos DPB1*04 e DRB1*15. Já o alelo DRB1*13 esteve associado à proteção contra GPA. O mecanismo pelo qual portadores do alelo DPB1*04 são mais suscetíveis à GPA ainda não é bem compreendido, porém sabe-se que esse *lócus* está localizado próximo aos genes responsáveis pela apoptose de neutrófilos. Acredita-se também que a região DPB1 esteja relacionada com a formação de granulomas, devido à alta prevalência deste mesmo alelo em indivíduos portadores de outra doença granulomatosa, a Beriliose.[46,64] Estes achados forneceram informações importantes para o entendimento da genética da GPA na população brasileira, especialmente a análise da árvore de decisões, que mostrou uma nova interdependência entre os alelos DPB1*0401, DPB1*0402, DRB1*13 e C*2.

Como já demonstrado anteriormente, em outras populações (americana, canadense, britânica e chinesa) a presença do alelo DPB1*0401 em homozigose correspondeu a um aumento de risco para a GPA, que foi de 81% em nossa população. A heterozigose de DPB1 *0401 com DPB1*0402 ou a presença da homozigose do alelo DPB1*0402 aumentou o risco da doença para 52,9%. Na ausência dos alelos DPB1*0401 e 0402 e do alelo DPB1*13, a presença do alelo C*2 surgiu como um novo fator de risco de 62,5% para a GPA, não descrito anteriormente nas outras populações avaliadas.

Além disso, observamos que na ausência dos alelos DPB1*0401 e DPB1*0402, a presença do alelo DRB1*13 diminuiu o risco da GPA para 0%. Assim, o conhecimento dessa interdependência entre os alelos e o risco de GPA poderá trazer novas pesquisas para um diagnóstico mais preciso, além de novos medicamentos para a doença, especialmente nas suas formas atípicas ou refratárias aos tratamentos habituais disponíveis. Assim, em um paciente com manifestações clínicas de GPA e ANCA positivo que durante o curso da doença não apresente evolução clínica esperada ou apresente refratariedade ao tratamento administrado, o estudo de seu HLA poderá trazer informações para confirmar a GPA ou fornecer outro diagnóstico a ser investigado. A descoberta de mecanismos genéticos exclusivos da GPA pode levar ao uso de agentes terapêuticos (farmacogenética) mais eficientes e com menores riscos de efeitos adversos.

Outro achado interessante de nosso estudo foi a observação do aumento do risco de GPA associado ao alelo DRB1*15, anteriormente só descrito na população americana,

principalmente nos afro-americanos, indicando que esse alelo deve ser predominante na população das Américas (Norte e Sul), especialmente na população de ascendência africana. Sugere-se que a participação direta do alelo DRB1*15 na gênese da GPA seja devido à expressão de suas moléculas na superfície de neutrófilos, que são capazes de se ligar ao antígeno-PR3 e seu peptídeo PR3 complementar.[47] Ainda não possuímos estudos para avaliar se essas ligações resultam em apresentação e ativação das células T.

O alelo DRB1*13 que demonstrou associação de proteção contra GPA, ainda apresenta dúvidas sobre o real mecanismo de proteção contra as VAA, porém acredita-se em uma apresentação de fragmentos dos grânulos azurófilos, gerando uma modulação negativa dos linfócitos T.[48]

A amostra de pacientes com GPA de nossa pesquisa demonstrou proporções raciais semelhantes às encontradas na população do estado de São Paulo, sugerindo uma amostra representativa de nossa população, a qual apresenta um grau de miscigenação com negros de origem africana (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição de raça/cor da pele no estado de São Paulo em porcentagem.

Estado	total	Branca	Morena	Parda	Negra	Moreno clara	Preta	amarelo
São Paulo	30616595	51,4%	17%	14,5%	8,9%	2,1%	1,3%	1,9%

Fonte: Adaptado IBGE 2011

Já o alelo DRB1*04 demonstrou associação com GPA na população holandesa[48] e não se reproduziu em outras etnias. Na população brasileira não observamos associação do alelo DRB1*04 com GPA. Uma possível explicação para tal fato é a baixa imigração holandesa para a região sudeste do Brasil. Estudos com pacientes de GPA na região nordeste do País, onde houve miscigenação com a população holandesa, no período de 1630 a 1654, durante a invasão dos estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco e Paraíba, poderiam esclarecer se o alelo DRB1*04 está realmente associado a esta etnia somente.

Li afirma que:

> Quando vários alelos estão associados a uma doença, são necessárias replicações de estudos em diferentes populações para identificar quais as variantes que realmente conferem risco à doença, possibilitando também a estimativa do risco atribuível na população ou de fatores modificadores específicos de cada população.[75]

6.1 Análise de outros possíveis alelos associados à GPA

O objetivo principal do estudo foi pesquisar a associação de alelos do sistema HLA já descrito em outras etnias na população brasileira que tem a particularidade de ser bastante miscigenada. Assim, pudemos confirmar que os alelos DPB1*04 e DRB1*15 estão associados a maior risco de GPA e o alelo DRB1*13 está associado à proteção contra a doença também na população brasileira, acrescentando evidências que ajudam a identificar quais são os alelos verdadeiramente associados à doença.

Optamos também em avaliar, como objetivo secundário, uma ampla análise de 113 outros alelos da região HLA, que não foram associados à GPA em outras populações, para descoberta de possíveis novos alelos da região HLA relacionadas a GPA na população brasileira. Nesta análise observamos 4 alelos que apresentaram $p<0.05$ quando comparados pacientes com GPA e os controles saudáveis: alelo B*7, C*16, DPA1*02 e DPB1*01. O alelo B*7 apresentou aumento de risco (OR de 2,59, p=0,022) e os demais apresentaram efeito de proteção contra a doença (OR de 0,15, p=0,039; OR de 0,29, p=0,001 e OR de 0,38, p=0,029). No entanto, quando aplicamos a correção de Bonferroni, para evitar achado de uma associação ao acaso devido as múltiplas comparações o valor de p ajustado para ser significante foi para 0,0004 fazendo com que os achados anteriores perdessem a significância estatística. A realização de múltiplas comparações entre as prevalências de alelos em casos e controles aumenta a chance de que associações "falso-positivas" sejam encontradas simplesmente pelo acaso (erro tipo I).[(76)] Portanto, é consenso na literatura científica que para minimizar o erro tipo I em estudos exploratórios, os quais envolvem múltiplas comparações entre grupos, é necessário o ajuste do valor do p para ser considerado estatisticamente significante.[75, 76] No entanto, resta a dúvida se esses alelos realmente estão associados ao risco e ou proteção da doença pois os demais 109 alelos estudados mostraram valores de p maiores

que 0,05 mostrando ser esta associação bem mais fracas do que para os 4 alelos apresentados. Assim, outros estudos avaliando estes 4 alelos com maior número de pacientes serão necessários para sabermos a real associação destes alelos com GPA.

Quanto a região DPA1, estudos provenientes dos Estados Unidos e Canadá mostraram também que esta região está associada a proteção contra GPA[66]. Em nosso estudo o alelo DPA1*02 apresentou p=0,001, estudos direcionados para este alelo em outras etnias poderão elucidar a estimativa do risco atribuível na população americana e a real associação com GPA.

6.2 Associação da positividade do ANCA e região HLA

Visto que a maioria dos genes da região HLA está relacionada com a autoimunidade, a subdivisão do grupo GPA em portadores ou não dos autoanticorpos ANCA deve ser considerada. Lyons e colaboradores demonstraram que as associações genéticas mais fortes foram relacionadas à presença do ANCA e não à apresentação clínica da GPA.[72] No estudo de Lyons, a presença do ANCA C, mais frequente em GPA, foi associada à região DP, e o ANCA P, mais presente na PAM, foi associada ao *lócus* DQ, demonstrando uma base genética diferente entre as duas síndromes, que apresentam manifestações clínicas muitas vezes sobrepostas.[72]

No presente estudo, dividimos os indivíduos do grupo GPA em portadores de ANCA (C + P), ANCA C e ANCA negativo. Em relação ao alelo DPB1*04, nossos resultados apresentaram um desfecho semelhante ao encontrado em outras etnias, indicando uma associação mais forte do alelo nos subgrupos ANCA e ANCA C, independente da apresentação clínica. No subgrupo ANCA positivo e DPB1*04, encontramos uma razão de chance (OR) de 5,07 para o diagnóstico de GPA em relação ao grupo controle, e quando consideramos o subgrupo de ANCA C, o OR foi de 5,47, ambos muito maiores que o OR do grupo GPA independente do ANCA, que foi de 2,7 (Tabela 11).

Esse fato não se repetiu ao avaliarmos o alelo DRB1*15, no qual encontramos um OR de 3,05 para o subgrupo ANCA e de 2,76 para o subgrupo ANCA C, enquanto para o grupo GPA independente do ANCA, o OR foi de 2,8.

Esses dados colaboram para considerarmos que a presença do alelo DPB1*04 apresenta uma relação fisiopatogênica com ANCA, enquanto a presença do alelo DRB1*15 está associada à apresentação clínica da GPA, independente da presença do ANCA.

Não existem dados na literatura sobre esta última comparação, pois, no único estudo que demonstrou a associação do alelo DRB1*15 com GPA, todos os indivíduos eram portadores do ANCA C.

Essas hipóteses fortalecem-se quando comparamos os subgrupos ANCA e ANCA C positivos com o subgrupo de indivíduos com ANCA negativo. Para o alelo DPB1*04, houve diferença estatística entre os grupos ANCA e ANCA C positivos *versus* GPA ANCA negativo, enquanto que para o DRB1*15 não houve, indicando que, em relação ao alelo DPB1*04, os subgrupos ANCA e ANCA C são populações diferentes do grupo GPA ANCA negativo.

O mecanismo pelo qual o alelo DPB1*04 está relacionado com ANCA C positivo ainda não está totalmente elucidado, porém Sibylle von Vietinghoff, em 2006, demonstrou que a interação entre os alelos da região HLA é determinante para a porcentagem de antígenos PR3 presentes na superfície dos neutrófilos.[77] Essa informação nos faz acreditar que o alelo DPB1*04 seja responsável pela apresentação de fragmentos do antígeno PR3 aos linfócitos CD4+.

Estudos recentes descobriram dois novos autoanticorpos anticitoplasma de neutrófilos, anti-Lamp-2 e anti-pentraxin-3, provavelmente também associados à região HLA, porém ainda não existem estudos de associação genética com os dois novos anticorpos.

6.3 HLA e manifestações clínicas

Estratificamos todos os pacientes estudados de acordo com as manifestações sistêmicas mais prevalentes, que foram: nódulos e massas cavitadas ou não, hemorragia alveolar, lesão em vias aéreas superiores e insuficiência renal aguda (IRA).

Os nossos resultados demonstraram significância estatística apenas nos indivíduos com o alelo DPB1*04 no subgrupo GPA com IRA *versus* grupo GPA sem IRA (p=0,01037). Em nosso estudo, 29% dos indivíduos apresentavam IRA e todos estes apresentavam o alelo DPB1*04 (100%).

Chang e colaboradores, também relacionaram a região HLA-DP com insuficiência renal, demonstrando que a presença do alelo DRB1*04 e a variante alélica DPB1*0402 são responsáveis por um pior prognóstico renal e baixa resposta aos medicamentos.[68] As demais manifestações clínicas avaliadas não apresentaram significância estatística em relação aos alelos estudados.

No entanto, a diversidade de apresentações clínicas da GPA, que vai desde quadros localizados em seios da face e vias aéreas até quadros de hemorragia alveolar maciça e insuficiência renal rapidamente progressiva, com altas taxas de mortalidade, deve representar manifestações fenotípicas de diferentes genótipos.

Assim, podemos concluir que a GPA e a presença de autoanticorpos contra citoplasma de neutrófilos (ANCA) e parede de lisossomo estão associadas aos alelos da região HLA classe II, e na ausência destes, os alelos da região HLA classe I. Já suas manifestações clínicas não parecem estar associadas às regiões HLA, com exceção da insuficiência renal aguda, que pode justificar os resultados positivos do uso da plasmaferese, a qual retira os autoanticorpos da circulação nos casos com insuficiência renal aguda grave (Cr > 5,7).

Visto que a região HLA só apresentou relação com IRA, acreditamos que os diferentes fenótipos da GPA possam estar relacionados com genes localizados fora da região HLA. Na literatura, vários genes fora da região HLA demonstraram associação com GPA.

Dentro dos genes estudados fora da região HLA os abaixo relacionados mostraram associação com a GPA:

- Gene SERPINA1: O gene SERPINA1 codifica a enzima α1-antitripsina. A presença dos alelos Z e S no gene SERPINA 1 resulta em baixa atividade da enzima α1-antitripsina. Estudos demonstraram que existe uma associação de ambos os alelos com GPA.[44, 57, 78, 79]

- Gene PRTN3: O gene PRTN3 codifica a proteinase 3 (PR3), uma protease intracelular de neutrófilos.[80] Nos pacientes com GPA, o aumento do número de neutrófilos PR3-positivos ocasiona uma alta taxa de reativação da GPA.[67]

- PTPN22: O gene PTPN22 codifica a tirosina fosfatase linfoide (Lyp), que pode aumentar a atividade das células CD4 e neutrófilos.[81, 82] Estudos com o gene PTPN22 demonstraram associação com GPA.[83]

- **CTLA-4:** Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4 ou CD 152) é uma molécula reguladora expressa em células T.[84] A GPA demonstrou associação com o alelo 86 do gene CTLA-4.[85]

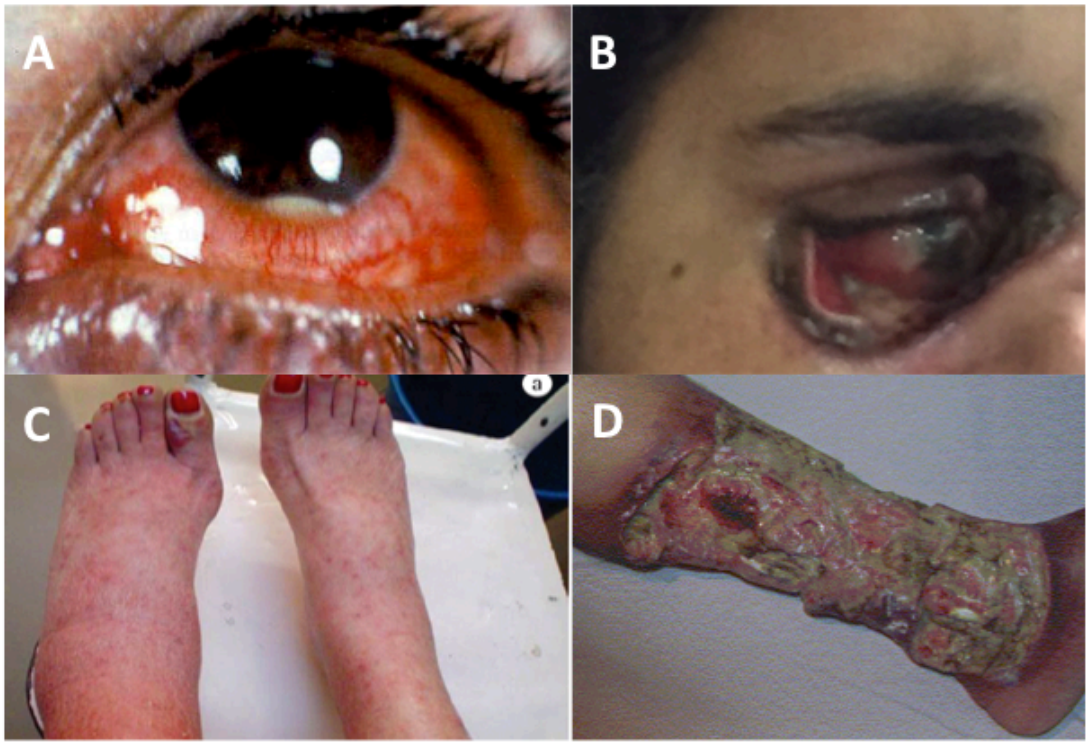
- SEMA6A: Existe uma potencial associação de GPA com o gene SEMA6A, que codifica a proteína semaforina 6A.[66] A função das proteínas pertencentes a essa família é incerta, embora seja proposto que as semaforinas possam estar envolvidas na regulação imune.[59]

Estudos necessitam ser feitos para relacionar estes e outros alelos a serem descritos com as diferentes manifestações clínicas da GPA. No entanto, faltam trabalhos relacionando as diferentes manifestações clínicas com os genes.

Na prática clínica, encontramos múltiplas e diversas manifestações clínicas associadas aos critérios de GPA.

No nosso ambulatório de vasculites, observamos um espectro variado tanto nas manifestações clínicas como na intensidade da doença. Por exemplo, podemos observar desde pequenos nódulos cavitados até grandes maças ou hemorragia alveolar fatal; o acometimento ocular varia desde episclerite leve até destruição de órbita; na pele, observamos desde petéquias até úlceras profundas e graves de difícil cicatrização e nos rins, observamos desde um acometimento leve com glomeruloesclerose segmentar e focal até insuficiência renal aguda rapidamente progressiva, com necessidade de diálise. (Figura 12)

Figura 12 – Manifestações clínicas com diferentes intensidades. A) Episclerite. B) Destruição da base da órbita. C) Petéquias e trombose em membros inferiores. D) Úlcera profunda com necrose.



Fonte**:** Ambulatório de Vasculites pulmonares HC/FMUSP/INCOR.

6.4 Interdependência dos alelos da região HLA.

O estudo aprofundado da árvore de decisões mostrou interdependência entre os alelos e a porcentagem de pacientes com GPA. O alelo DPB1*04 em suas duas variáveis (01 e 02) está associado a GPA independente da presença de outros alelos. Na ausência deste alelo o alelo DRB1*13 demonstrou ser um alelo de proteção para GPA, assim como recentemente este alelo também foi associado com proteção na Poliangeíte microscópica (outra vasculite ANCA associada). [86]

A árvore de decisões além de demonstrar que os alelos das regiões HLA apresentam interdependência entre si no âmbito de risco e proteção para GPA, apresentou um inédito alelo C*2 relacionado ao risco de 62% de GPA, na ausência dos alelos clássicos DPB1*0401 e DPB1*0402 e DRB1*13.

O alelo C*2 ao contrário dos outros alelos encontrados na GPA está situado na região HLA classe I, presente em todas as células nucleadas do genoma humano. A presença desta região em nossa população adiciona uma nova evidência da participação das infecções virais ou bacterianas (intracelulares) na gênese da GPA.[87]

Outras doenças autoimunes como a esclerose múltipla e a doença de Graves também apresentaram associação com a região HLA-Cw.[87] Estes dados da literatura reforçam nossa hipótese de que o alelo C*2 é uma nova região que deve ser explorada em estudos futuros.

Assim, nosso estudo mostrou ser a GPA uma doença de genética complexa, com fatores de risco em comum a várias etnias e outros específicos de determinadas populações. A análise da árvore de decisões foi fundamental para mostrar a complexa interação alélica entre risco e proteção contra a GPA na nossa população, além de mostrar o aparecimento do alelo C*2 da região HLA I como novo fator de risco para GPA na ausência dos alelos clássicos associados à doença.

6.5 Limitações do estudo

A principal limitação do estudo foi causada pela baixa prevalência e difícil diagnóstico da Granulomatose com poliangeíte, que resultou em um número reduzido de indivíduos na amostra, principalmente nos subgrupos.

Outra limitação ocorreu porque usamos a técnica de microarranjos, a qual tipificou ao mesmo tempo 121 alelos, acarretando na falha de análise em alguns alelos isolados. A reanálise foi usada apenas no grupo GPA devido à dificuldade da compra de kits não comercializados no Brasil.

Apesar destes cuidados técnicos, para alguns pacientes e controles nós não pudemos utilizar o resultado de todos os alelos por não apresentar a qualidade necessária para ser incluída na análise. Nos resultados do estudo, especificamos o número de indivíduos incluídos na análise de cada alelo.

Por fim, temos que considerar que estudos caso-controle em genética demostram apenas associação entre as variáveis e não são capazes de comprovar uma relação de causa e efeito.

7. CONCLUSÃO

A tipificação do HLA da amostra de portadores de Granulomatose com poliangeíte e controles provenientes da população brasileira indicou que os alelos DPB1*04 e DRB1*15 estão associados ao aumento de risco da doença, com *odds ratio* de 2,9 (1,09-3,8) e 2,87 (1,4-4,7) respectivamente. O alelo DRB1*04 não apresentou associação estatisticamente significante com a doença em nossa amostra. O alelo DRB1*13 apresentou associação de proteção contra GPA, OR 0,42 (IC95% 0,21-0,99).

Dentre os outros 113 alelos da região HLA classe I e II, os alelos B*7, C*16, DPA1*02 e DPB1*01 apresentaram associação estatisticamente significante com GPA ($p<0,05$), porém foram excluídos após correção para múltiplos testes, que exigiu $p<0,0004$. Os demais alelos estudados não demonstraram significância estatística em relação à GPA.

O alelo DPB1*04 apresenta maior associação com a presença do autoanticorpo ANCA do que com a apresentação clínica, enquanto o mesmo não acontece com o DRB1*15, o qual aparenta uma associação com a doença independente da presença do autoanticorpo ANCA.

Dentre as manifestações clínicas, a única associação significante encontrada foi a maior prevalência de insuficiência renal aguda nos portadores do alelo DPB1*04.

A árvore de decisões demonstrou uma associação de interdependência entre os alelos DPB1*0401, 0402, DRB1*13, C*2 e a GPA.

8. REFERÊNCIAS

1 Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC, et al. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): an alternative name for Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum. 2011;63(4):863-4.

2 Seo P, Stone JH. The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. Am J Med. 2004;117(1):39-50.

3 Gomez-Puerta JA, Hernandez-Rodriguez J, Lopez-Soto A, Bosch X. Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides and respiratory disease. Chest. 2009;136(4):1101-11.

4 Wegener F. On generalised septic vessel diseases. By Friedrich Wegener, 1937 (translation). Thorax. 1987;42(12):918-9.

5 Woywodt A, Haubitz M, Haller H, Matteson EL. Wegener's granulomatosis. Lancet. 2006;367(9519):1362-6.

6 Lutalo PM, D'Cruz DP. Diagnosis and classification of granulomatosis with polyangiitis (aka Wegener's granulomatosis). J Autoimmun. 2014;48-49:94-8.

7 Barbas CS AT. Granulomatose de Wegener. Diretriz de vasculites pulmonares. J Bras Pneumol. 2005.

8 Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA, et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. Nat Med. 2008;14(10):1088-96.

9 Kain R, Matsui K, Exner M, Binder S, Schaffner G, Sommer EM, et al. A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. J Exp Med. 1995;181(2):585-97.

10 Simon A, Subra JF, Guilpain P, Jeannin P, Pignon P, Blanchard S, et al. Detection of Anti-Pentraxin-3 Autoantibodies in ANCA-Associated Vasculitis. PLoS One. 2016;11(1):e0147091.

11 Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD, et al. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. Ann Intern Med. 1992;116(6):488-98.

12 Fauci AS, Haynes BF, Katz P, Wolff SM. Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. Ann Intern Med. 1983;98(1):76-85.

13 Jennette JC, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. N Engl J Med. 1997;337(21):1512-23.

14 Reinhold-Keller E, Beuge N, Latza U, de Groot K, Rudert H, Nolle B, et al. An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis: long-term outcome in 155 patients. Arthritis Rheum. 2000;43(5):1021-32.

15 Harper SL, Letko E, Samson CM, Zafirakis P, Sangwan V, Nguyen Q, et al. Wegener's granulomatosis: the relationship between ocular and systemic disease. J Rheumatol. 2001;28(5):1025-32.

16 Fechner FP, Faquin WC, Pilch BZ. Wegener's granulomatosis of the orbit: a clinicopathological study of 15 patients. Laryngoscope. 2002;112(11):1945-50.

17 Garovic VD, Clarke BL, Chilson TS, Specks U. Diabetes insipidus and anterior pituitary insufficiency as presenting features of Wegener's granulomatosis. Am J Kidney Dis. 2001;37(1):E5.

18 Czarnecki EJ, Spickler EM. MR demonstration of Wegener granulomatosis of the infundibulum, a cause of diabetes insipidus. AJNR Am J Neuroradiol. 1995;16(4 Suppl):968-70.

19 Pagnoux C, Mahr A, Cohen P, Guillevin L. Presentation and outcome of gastrointestinal involvement in systemic necrotizing vasculitides: Analysis of 62 patients with polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener granulomatosis, Churg-Strauss syndrome, or rheumatoid arthritis-associated vasculitis. Medicine (Baltimore). 2005;84(2):115-28.

20 Zinck SE, Schwartz E, Berry GJ, Leung AN. CT of noninfectious granulomatous lung disease. Radiol Clin North Am. 2001;39(6):1189-209, vi.

21 Almuhaideb A, Syed R, Iordanidou L, Saad Z, Bomanji J. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET/CT rare finding of a unique multiorgan involvement of Wegener's granulomatosis. Br J Radiol. 2011;84(1006):e202-4.

22 Telma A. Estudo da apoptose na granulomatose de Wegener. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.

23 Barros JM. Estudo da camada elástica das arteríolas pulmonares em portadores de granulomatose de Wegener [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007.

24 Santana AN. Estudo da trombose microvascular em biópsias pulmonares de pacientes com granulomatose de Wegener [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.

25 Lally L, Spiera R. Current landscape of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: classification, diagnosis, and treatment. Rheum Dis Clin North Am. 2015;41(1):1-19, vii.

26 Santana AN, Woronik V, Halpern AS, Barbas CS. Treatment of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: update. J Bras Pneumol. 2011;37(6):809-16.

27 Novack SN, Pearson CM. Cyclophosphamide therapy in Wegener's granulomatosis. N Engl J Med. 1971;284(17):938-42.

28 Mahr AD, Neogi T, Merkel PA. Epidemiology of Wegener's granulomatosis: Lessons from descriptive studies and analyses of genetic and environmental risk determinants. Clin Exp Rheumatol. 2006;24(2 Suppl 41):S82-91.

29 Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum. 1990;33(8):1101-7.

30 Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. Arthritis Rheum. 1994;37(2):187-92.

31 Watts RA, Gonzalez-Gay MA, Lane SE, Garcia-Porrua C, Bentham G, Scott DG. Geoepidemiology of systemic vasculitis: comparison of the incidence in two regions of Europe. Ann Rheum Dis. 2001;60(2):170-2.

32 Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C. Epidemiology of the vasculitides. Rheum Dis Clin North Am. 2001;27(4):729-49.

33 Souza FH, Radu Halpern AS, Valente Barbas CS, Shinjo SK. Wegener's granulomatosis: experience from a Brazilian tertiary center. Clin Rheumatol. 2010;29(8):855-60.

34 Watts RA, Scott DG, Jayne DR, Ito-Ihara T, Muso E, Fujimoto S, et al. Renal vasculitis in Japan and the UK: are there differences in epidemiology and clinical phenotype? Nephrol Dial Transplant. 2008;23(12):3928-31.

35 Kobayashi S, Fujimoto S. Epidemiology of vasculitides: differences between Japan, Europe and North America. Clin Exp Nephrol. 2013;17(5):611-4.

36 Scott DG, Watts RA. Systemic vasculitis: epidemiology, classification and environmental factors. Ann Rheum Dis. 2000;59(3):161-3.

37 Stegeman CA, Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, de Jong PE, Kallenberg CG. Association of chronic nasal carriage of Staphylococcus aureus and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. Ann Intern Med. 1994;120(1):12-7.

38 Popa ER, Tervaert JW. The relation between Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis: current knowledge and future directions. Intern Med. 2003;42(9):771-80.

39 Hogan SL, Satterly KK, Dooley MA, Nachman PH, Jennette JC, Falk RJ, et al. Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis. J Am Soc Nephrol. 2001;12(1):134-42.

40 Beaudreuil S, Lasfargues G, Laueriere L, El Ghoul Z, Fourquet F, Longuet C, et al. Occupational exposure in ANCA-positive patients: a case-control study. Kidney Int. 2005;67(5):1961-6.

41 Albert D, Clarkin C, Komoroski J, Brensinger CM, Berlin JA. Wegener's granulomatosis: Possible role of environmental agents in its pathogenesis. Arthritis Rheum. 2004;51(4):656-64.

42 Gao Y, Zhao MH. Review article: Drug-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Nephrology (Carlton). 2009;14(1):33-41.

43 Audrain MA, Sesboue R, Baranger TA, Elliott J, Testa A, Martin JP, et al. Analysis of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): frequency and specificity in a sample of 191 homozygous (PiZZ) alpha1-antitrypsin-deficient subjects. Nephrol Dial Transplant. 2001;16(1):39-44.

44 Elzouki AN, Segelmark M, Wieslander J, Eriksson S. Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. J Intern Med. 1994;236(5):543-8.

45 Mahr AD, Edberg JC, Stone JH, Hoffman GS, St Clair EW, Specks U, et al. Alpha(1)-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum. 2010;62(12):3760-7.

46 Jagiello P, Gencik M, Arning L, Wieczorek S, Kunstmann E, Csernok E, et al. New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. Hum Genet. 2004;114(5):468-77.

47 Cao Y, Schmitz JL, Yang J, Hogan SL, Bunch D, Hu Y, et al. DRB1*15 allele is a risk factor for PR3-ANCA disease in African Americans. J Am Soc Nephrol. 2011;22(6):1161-7.

48 Stassen PM, Cohen-Tervaert JW, Lems SP, Hepkema BG, Kallenberg CG, Stegeman CA. HLA-DR4, DR13(6) and the ancestral haplotype A1B8DR3 are associated with ANCA-associated vasculitis and Wegener's granulomatosis. Rheumatology (Oxford). 2009;48(6):622-5.

49 Sadler TL. Langman Embriologia médicacion orientacion clinica. Médica Panamericana. 2001;8.

50 Brodsky FM, Lem L, Bresnahan PA. Antigen processing and presentation. Tissue Antigens. 1996;47(6):464-71.

51 Abul K Abbas AHL, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology: Elsevier; 2007:97-113.

52 Monach PA, Merkel PA. Genetics of vasculitis. Curr Opin Rheumatol. 2010;22(2):157-63.

53 Watts RA, Scott DG. Epidemiology of the vasculitides. Semin Respir Crit Care Med. 2004;25(5):455-64.

54 Knight A, Sandin S, Askling J. Risks and relative risks of Wegener's granulomatosis among close relatives of patients with the disease. Arthritis Rheum. 2008;58(1):302-7.

55 Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. Arthritis Rheum. 2009;60(3):661-8.

56 Wieczorek S, Holle JU, Epplen JT. Recent progress in the genetics of Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome. Curr Opin Rheumatol. 2010;22(1):8-14.

57 Alberici F, Martorana D, Vaglio A. Genetic aspects of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Nephrol Dial Transplant. 2015;30 Suppl 1:i37-45.

58 Willcocks LC, Lyons PA, Rees AJ, Smith KG. The contribution of genetic variation and infection to the pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. Arthritis Res Ther. 2010;12(1):202.

59 Muzes G, Sipos F. Relation of immune semaphorin/plexin signaling to carcinogenesis. Eur J Cancer Prev. 2014;23(5):469-76.

60 Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. N Engl J Med. 2000;343(10):702-9.

61 Kathleen E Sullivan EEM. Immunogenetics 2011:367-86.

62 Jagiello P, Gross WL, Epplen JT. Complex genetics of Wegener granulomatosis. Autoimmun Rev. 2005;4(1):42-7.

63 Borgmann S, Haubitz M. Genetic impact of pathogenesis and prognosis of ANCA-associated vasculitides. Clin Exp Rheumatol. 2004;22(6 Suppl 36):S79-86.

64 Richeldi L, Sorrentino R, Saltini C. HLA-DPB1 glutamate 69: a genetic marker of beryllium disease. Science. 1993;262(5131):242-4.

65 Heckmann M, Holle JU, Arning L, Knaup S, Hellmich B, Nothnagel M, et al. The Wegener's granulomatosis quantitative trait locus on chromosome 6p21.3 as characterised by tagSNP genotyping. Ann Rheum Dis. 2008;67(7):972-9.

66 Xie G, Roshandel D, Sherva R, Monach PA, Lu EY, Kung T, et al. Association of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) with HLA-DPB1*04 and SEMA6A gene variants: evidence from genome-wide analysis. Arthritis Rheum. 2013;65(9):2457-68.

67 Rarok AA, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. J Am Soc Nephrol. 2002;13(9):2232-8.

68 Chang DY, Luo H, Zhou XJ, Chen M, Zhao MH. Association of HLA genes with clinical outcomes of ANCA-associated vasculitis. Clin J Am Soc Nephrol. 2012;7(8):1293-9.

69 Hogan SL, Falk RJ, Nachman PH, Jennette JC. Various forms of life in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Ann Intern Med. 2006;144(5):377-8; author reply 8-9.

70 Hoffman GS, Langford CA. Are there different forms of life in the antineutrophil cytoplasmic antibody universe? Ann Intern Med. 2005;143(9):683-5.

71 Linder R, Orth I, Hagen EC, van der Woude FJ, Schmitt WH. Differentiation between Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis by an artificial neural network and by traditional methods. J Rheumatol. 2011;38(6):1039-47.

72 Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, Holle JU, Watts RA, Jayne DR, et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. N Engl J Med. 2012;367(3):214-23.

73 IBGE. Étnico-Racial da população. Um Estudo das categorias de classificação de cor ou raça 2008-2011.

74 Heinemann FM. HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex Multiplex Technology. Transfus Med Hemother. 2009;36(4):273-8.

75 Li J. studies in complex disease. concepts and applications current topics in human genetics. 2007:1.

76 Austin PC, Mamdani MM, Juurlink DN, Hux JE. Testing multiple statistical hypotheses resulted in spurious associations: a study of astrological signs and health. J Clin Epidemiol. 2006;59(9):964-9.

77 von Vietinghoff S, Busjahn A, Schonemann C, Massenkeil G, Otto B, Luft FC, et al. Major histocompatibility complex HLA region largely explains the genetic variance exercised on neutrophil membrane proteinase 3 expression. J Am Soc Nephrol. 2006;17(11):3185-91.

78 Baslund B, Szpirt W, Eriksson S, Elzouki AN, Wiik A, Wieslander J, et al. Complexes between proteinase 3, alpha 1-antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies: a comparison between alpha 1-antitrypsin PiZ allele carriers and non-carriers with Wegener's granulomatosis. Eur J Clin Invest. 1996;26(9):786-92.

79 Borgmann S, Endisch G, Urban S, Sitter T, Fricke H. A linkage disequilibrium between genes at the serine protease inhibitor gene cluster on chromosome 14q32.1 is associated with Wegener's granulomatosis. Clin Immunol. 2001;98(2):244-8.

80 Witko-Sarsat V, Lesavre P, Lopez S, Bessou G, Hieblot C, Prum B, et al. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. J Am Soc Nephrol. 1999;10(6):1224-33.

81 Maine CJ, Hamilton-Williams EE, Cheung J, Stanford SM, Bottini N, Wicker LS, et al. PTPN22 alters the development of regulatory T cells in the thymus. J Immunol. 2012;188(11):5267-75.

82 Bayley R, Kite KA, McGettrick HM, Smith JP, Kitas GD, Buckley CD, et al. The autoimmune-associated genetic variant PTPN22 R620W enhances neutrophil activation and function in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. Ann Rheum Dis. 2015;74(8):1588-95.

83 Jagiello P, Aries P, Arning L, Wagenleiter SE, Csernok E, Hellmich B, et al. The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum. 2005;52(12):4039-43.

84 Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. Curr Opin Immunol. 2002;14(3):391-6.

85 Bonatti F, Reina M, Neri TM, Martorana D. Genetic Susceptibility to ANCA-Associated Vasculitis: State of the Art. Front Immunol. 2014;5:577.

86 Kawasaki A, Hasebe N, Hidaka M, Hirano F, Sada KE, Kobayashi S, et al. Protective Role of HLA-DRB1*13:02 against Microscopic Polyangiitis and MPO-ANCA-Positive Vasculitides in a Japanese Population: A Case-Control Study. PLoS One. 2016;11(5):e0154393.

87 Gough SC, Simmonds MJ. The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. Curr Genomics. 2007;8(7):453-65.

9. ANEXOS

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (HCFMUSP)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº .....

APTO: ..... BAIRRO: .....

CIDADE .....CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL: .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: ..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: ESTUDO CASO-CONTROLE DA REGIÃO HLA DE PACIENTES COM GRANULOMATOSE COM POLIANGEÍTE.

2. PESQUISADOR: MARCOS SOARES TAVARES
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO COLABORADOR
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 121046
UNIDADE DO HCFMUSP: PNEUMOLOGIA HC/INCOR

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	**X**	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

Justificativa e objetivos da Pesquisa:

Após o estudo e melhor entendimento da genética dos pacientes com Granulomatose com Poliangeíte, possivelmente poderemos ter maior facilidade e rapidez no diagnóstico dessa doença. Você está sendo convidado a participar desta pesquisa, pois a Granulomatose com Poliangeíte é uma doença rara e por isso existem poucos estudos no mundo e nenhum no Brasil sobre o papel da genética no desenvolvimento dessa doença.

Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

- Caso você aceite participar do estudo, seu sangue será coletado.
- Coleta de sangue da veia do antebraço: para a realização do exame que pesquisará a carga genética. Em seguida, iremos comparar com amostras de outros pacientes portadores da mesma doença, com o intuito de encontrar genes em comum entre os participantes. Esses genes em comum podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da Granulomatose com Poliangeíte ou colaborarem para isso.

Desconfortos e riscos esperados:

Não é esperado que haja riscos durante a coleta de sangue.
Durante a coleta, poderá ocorrer dor no local de entrada da agulha, semelhante às outras vezes em que você já colheu sangue.

Benefícios que poderão ser conseguidos:

Existe uma busca em entender melhor o papel da genética em doenças raras como a Granulomatose com Poliangeíte, e não há nenhum estudo que analise a genética desses pacientes na população brasileira. Achados deste estudo podem colaborar para entender a genética, facilitando e antecipando o diagnóstico da Granulomatose de Wegener no futuro.

Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Nenhum.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "ESTUDO CASO-CONTROLE DA REGIÃO HLA DE PACIENTES COM GRANULOMATOSE COM POLIANGEÍTE".

Eu discuti com o Dr. Marcos Soares Tavares sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.
(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO GENÉTICO CASO-CONTROLE DE PACIENTES COM GRANULOMATOSE COM POLIANGEÍTE
Pesquisador Responsável: Carmem Silvia Valente Barbas **Versão: 3**
Pesquisador Executante: Marcos Soares Tavares **CAAE:** 16652113.9.0000.0068
Co-autores: Helcio Rodrigues, Nicolas Panajotopoulos, Rosana Câmara Agondi
Finalidade Acadêmica Doutorado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9878

Número do Parecer: 419.585

Data da Relatoria: 09/10/2013 *Ad-referendum*

Apresentação do Projeto: Adequada

Objetivo da Pesquisa: Estudar o perfil do HLA dos nossos pacientes portadores de Granulomatose com poliangeite de nosso ambulatório de vasculites do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo comparada a um grupo controle de pessoas normais sem a doença (doadores de órgãos sólidos do INCOR, pareado para idade, sexo e cor da pele e compará-lo com o perfil europeu já estudado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos mínimos, não há beneficio direto para o paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto tem mérito científico

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O pesquisador cumpriu as sugestões conforme solicitado em parecer anterior.

Recomendações: Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O pesquisador cumpriu as recomendações anteriores. Aprovado
Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)**apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Dr. Rogério de Souza
Pós-Graduação da FMUSP
Lab. de Dermatologia

São Paulo, 09 de Outubro de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq

15 10 13
Coaine

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO B

O **equilíbrio de Hardy-Weinberg** (também **princípio de Hardy-Weinberg** ou **lei de Hardy-Weinberg**) é a base da genética de populações. Afirma que, em uma população mendeliana, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas permanecerão constantes no passar das gerações. Independentemente de um gene ser raro ou frequente, sua frequência permanecerá a mesma com relação aos outros desde que essas condições sejam mantidas.

As condições para o equilíbrio Hardy-Weinberg são baseadas em uma população considerada ideal, ou seja:

- Infinita (no sentido de eliminar-se a deriva genética);
- Reprodução sexuada;
- Acasalamento aleatório (ausência de seleção sexual ou desvio de aleatoriedade por dispersão geográfica);
- Organismos diploides;
- Número igual de ambos os sexos;
- Todos os casais são férteis e com o mesmo número de prole.

Em outras palavras, a população precisa ser infinitamente grande, reproduzir-se aleatoriamente e não estar sujeita à evolução.

As causas de desvios do EHW na população podem ser resultantes dos seguintes fatores:

a) Consanguinidade: casamentos entre parentes próximos, pois o EHW depende de intercruzamentos aleatórios;

b) Deriva Gênica: processo no qual a população é isolada, com um número limitado de possibilidades de intercruzamentos;

c) Migração;

d) Novas mutações: apenas mutações muito recentes podem quebrar o EHW, pois o equilíbrio é geralmente alcançado dentro de uma geração em uma população grande o suficiente;

e) Seleção: uma desvantagem seletiva de um alelo em particular leva à morte fetal.

Desvios do EHW também podem ser sinal de problemas metodológicos em estudos genéticos (erros na genotipagem ou estratificação populacional).

ANEXO C

Os alelos B*7 (P-0,02) apresentariam associação positiva com GPA, enquanto os alelos C*16 (p-0,03), DPA1*2 (p-0,001) e DPB1*1 (p-0,02) demonstrariam uma relação negativa com Granulomatose com poliangeíte. Porém, ao realizarmos a correção de Bonferroni, essas associações perderam significância estatística, demonstrando que um número maior de pacientes deverão ser avaliados quanto a essas associações para sabermos o real significado delas.

ANEXO D

	Controle		GPA				
	N	%	N	%	OR	Valor-p	
A*1	22	20,00	5	9,80	0,43	0,131	1
A*2	45	40,91	25	49,02	1,39	0,748	1
A*3	14	12,73	12	23,53	2,11	0,083	1
A*11	13	11,82	7	13,73	1,19	0,621	1
A*23	13	11,82	3	5,88	0,47	0,391	2
A*24	19	17,27	9	17,65	1,03	0,858	1
A*25	4	3,64	2	3,92	1,08	1,000	2
A*26	4	3,64	3	5,88	1,66	0,680	2
A*29	15	13,64	2	3,92	0,26	0,062	1
A*30	12	10,91	8	15,69	1,52	0,393	1
A*31	12	10,91	5	9,80	0,89	0,832	1
A*32	8	7,27	4	7,84	1,09	0,745	2
A*33	11	10,00	4	7,84	0,77	0,777	2
A*34	1	0,91	0	0,00		1,000	2
A*36	0	0,00	0	0,00		-	
A*66	0	0,00	0	0,00		-	
A*68	11	10,00	4	7,84	0,77	0,754	2
A*69	0	0,00	0	0,00		-	
A*74	4	3,64	1	1,96	0,53	1,000	2

[1]Teste qui-quadrado; [2]Teste exato de Fisher

	Controle		GPA				
	N	%	N	%	OR	Valor-p	
B*7	14	12,73	14	27,45	2,59	0,022	1
B*8	12	10,91	6	11,76	1,09	0,873	1
B*11	0	0,00	0	0,00		-	
B*13	4	3,64	2	3,92	1,08	1,000	2
B*14	20	18.,8	5	9,80	0,49	0,251	1
B*15	18	16,36	9	17,65	1,10	0,954	1
B*18	8	7,27	6	11,76	1,70	0,351	2
B*27	4	3,64	4	7,84	2,26	0,264	2
B*35	22	20,00	14	27,45	1,51	0,282	1
B*37	1	0,91	1	1,96	2,18	0,535	2
B*38	5	4,55	1	1,96	0,42	0,666	2
B*39	8	7,27	3	5,88	0,80	1,000	2
B*40	12	10,91	5	9,80	0,89	0,832	1
B*41	1	0,91	0	0,00		1,000	2
B*42	3	2,73	2	3,92	1,46	0,652	2
B*44	20	18,18	3	5,88	0,28	0,077	1
B*45	3	2,73	0	0,00		0,552	2
B*47	1	0,91	0	0,00		1,000	2
B*48	0	0,00	0	0,00		-	
B*49	6	5,45	1	1,96	0,35	0,433	2
B*50	6	5,45	4	7,84	1,48	0,727	2
B*51	17	16,36	7	13,73	0,88	0,549	1
B*52	3	2,73	5	3,92	1,46	0,652	2
B*53	4	3,64	1	1,96	0,53	1,000	2
B*54	0	0,00	0	0,00		-	
B*55	3	2,73	0	0,00		0,552	2
B*57	9	8,18	2	3,92	0.46	0,505	2
B*58	3	2,73	3	5,88	2.23	0,382	2
B*73	1	0,91	0	0,00		1,000	2
B*81	2	1,82	0	0,00		1,000	2

[1]Teste qui-quadrado; [2]Teste exato de Fisher

	Controle		GPA				
	N	**%**	**N**	**%**	**OR**	**Valor-p**	
C*1	5	4,59	4	7,84	1,77	0,468	2
C*2	9	8,26	8	15,69	2,07	0,264	1
C*3	22	20,18	9	17,65	0,85	0,603	1
C*4	27	24,77	15	29,41	1,27	0,414	1
C*5	12	11,01	2	3,92	0,33	0,227	2
C*6	17	15,60	8	15,69	1,01	0,781	1
C*7	39	35,78	26	50,98	1,87	0,117	1
C*8	23	21,10	5	9,80	0,41	0,146	1
C*12	16	14,68	5	9,80	0,63	0,468	1
C*14	7	6,42	5	9,80	1,58	0,523	2
C*15	10	9,17	6	11,76	1,32	0,767	2
C*16	13	11,93	1	1,96	0,15	0,039	2
C*17	4	3,67	2	3,92	1,07	1,000	2
C*18	3	2,75	1	1,96	0,71	1,000	2

[1]Teste qui-quadrado; [2]Teste exato de Fisher

	Controle		GPA				
	N	**%**	**N**	**%**	**OR**	**Valor-p**	
DRB1*1	19	17,27	11	21,15	1,28	0,399	[1]
DRB1*3	27	24,55	8	15,38	0,56	0,140	[1]
DRB1*4	25	22,73	10	19,23	0,81	0,762	[1]
DRB1*7	26	23,64	10	19,23	0,77	0,574	[1]
DRB1*8	8	7,27	9	17,31	2,67	0,240	[2]
DRB1*9	5	4,55	0	0,00		0,177	[2]
DRB1*10	2	1,82	0	0,00		1,000	[2]
DRB1*11	17	15,45	9	17,31	1,15	0,970	[1]
DRB1*12	7	6,36	0	0,00		0,098	[2]
DRB1*13	30	27,27	7	13,46	0,41	0,042	[1]
DRB1*14	12	10,91	5	9,62	0,87	0,925	[1]
DRB1*15	21	19,09	21	40,38	2,87	0,006	[1]
DRB1*16	7	6,36	5	9,62	1,57	0,525	[2]

[1]Teste qui-quadrado; [2]Teste exato de Fisher

	Controle		GPA			
	N	**%**	**N**	**%**	**OR**	**Valor-p**
DQA*1	70	63,64	38	70,37	1,36	0,527 [1]
DQA*2	23	20,91	10	18,52	0,86	0,792 [1]
DQA*3	31	28,18	11	20,37	0,65	0,353 [1]
DQA*4	10	9,09	7	12,96	1,49	1,000 [2]
DQA*5	50	45,45	21	38,89	0,76	0,441 [1]
DQA*6	1	0,91	1	1,85	2,06	0,551 [2]
DQB*2	48	43,64	18	32,73	0,63	0,272 [1]
DQB*3	47	42,73	25	45,45	1,12	0,555 [1]
DQB*4	14	12,73	8	14,55	1,17	0,910 [1]
DQB*5	35	31,82	18	32,73	1,04	0,833 [1]
DQB*6	45	40,91	25	45,45	1,20	0,879 [1]

[1]Teste qui-quadrado; [2]Teste exato de Fisher

	Controle		GPA				
	N	%	N	%	OR	Valor-p	
DPA1*1	79	88,76	49	92,45	1.55	0.498	2
DPA1*2	49	55,06	14	26,42	0.29	0.001	1
DPA1*3	2	2,25	1	1,89	0.84	1.000	2
DPA1*4	2	2,25	1	1,89	0.84	1.000	2
DPB1*1	19	17,27	4	7,27	0.38	0.029	1
DPB1*2	28	31,82	11	20,75	0.56	0.103	1
DPB1*3	13	14,77	6	11,32	0.74	0.561	1
DPB1*4(01+02) 50	56,8	42	79,2	2,901	0.007		1
DPB1*4002	16	18,18	18	33.96	2.31	0,055	1
DPB1*0401	39	44,32	33	62.26	2.07	0,778	2
DPB1*5	4	4,55	1	1.89	0.40	0,297	2
DPB1*6	2	2,27	0	0.00		0,527	2
DPB1*9	3	3,41	1	1.89	0.54	1,000	2
DPB1*10	4	4,55	2	3.77	0.82	1,000	2
DPB1*11	2	2,27	1	1.89	0.83	1,000	2
DPB1*13	6	6,82	1	1.89	0.26	0,255	2
DPB1*14	8	9,09	3	5.66	0.60	0,536	2
DPB1*16	1	1,14	0	0.00		1,000	2
DPB1*17	7	7,95	2	3.77	0.45	0,710	2
DPB1*18	1	1,14	1	1.89	1.67	1,000	
DPB1*23	0	0,00	0	0.00		-	2
DPB1*105	1	1,14	0	0.00		1,000	
DPB1*131	0	0,00	0	0.00		-	2
DPB1*148	1	1,14	0	0.00		1,000	
DPB1*20	0	0,00	0	0.00		-	2
DPB1*27	2	2,27	0	0.00		0,527	2
DPB1*39	1	1,14	0	0.00		1,000	2
DPB1*45	1	1,14	0	0.00		1,000	
DPB1*85	0	0,00	0	0.00		-	
DPB1*86	0	0,00	0	0.00		-	

[1]Teste qui-quadrado; [2]Teste exato de Fisher

ANEXO E

		Hemorragia alveolar				
		Ausente		Presente		
Total		N	%	N	%	Valor-p
DPB1*04	42	33	78,6%	9	21,4%	0.667079 [2]
DRB1*15	21	19	90,4%	2	9,52%	0,285

		nódulos/massa				
		Ausente		Presente		
Total		N	%	N	%	Valor-p
DPB1*04	42	16	38,1%	26	61,9%	1 [2]
DRB1*15	21	8	38,1%	13	61,9%	0,72

		Manifestação em seios da face				
		Ausente		Presente		
Total		N	%	N	%	Valor-p
DPB1*04	42	23	54,8%	19	45,2%	0,581995 [1]
DRB1*15	21	12	57,2%	9	42,8%	0,908

ANEXO F

Árvores de decisões são diagramas que permitem representar e avaliar problemas que envolvem decisões sequenciais, colocando em destaque os riscos e os resultados identificados nos diversos cursos de ação.