

**ALZÍRTON DE LIRA FREIRE.**

**ALELOS HLA-DR EM PACIENTES COM  
POLIARTERITE NODOSA E POLIANGÍTE MICROSCÓPICA.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP) para obtenção do título de  
Doutor em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes.

Co-orientador: Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo.

Campinas, 2009.

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

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

F883a Freire, Alzirton de Lira  
Alelos HLA-DR em pacientes com poliarterite nodosa e poliangíte  
microscópica / Alzirton de Lira Freire. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Sandra Regina Muchinechi Fernandes, Manoel  
Barros Bértolo

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

1. Antígenos HLA. 2. Poliarterite nodosa. 3. Vasculite. 4.  
Auto - imunidade. I. Fernandes, Sandra Regina Muchinechi. II.  
Bértolo, Manoel Barros. III. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês: Alleles HLA-DR in patients with polyarteritis nodosa and  
microscopic polyangiitis.**

**Keywords: HLA antigens, Polyarteritis nodosa, Vasculitis, Autoimmunity.**

**Titulação: Clínica Médica.**

**Área de concentração: Clínica Médica.**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes.**

**Prof. Dr. José Roberto Provenza.**

**Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior.**

**Profa. Dra. Ilma Aparecida Paschoal.**

**Prof. Dr. Percival Degrava Sampaio Barros.**

**Data da defesa: 26-06-2009.**

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

Alzirton de Lira Freire

---

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Regina Muchinechi Fernandes

---

---

### Membros:

1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma Aparecida Paschoal
2. Prof. Dr. Percival Degrava Sampaio Barros
3. Prof. Dr. José Roberto Provenza
4. Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior
5. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Regina Muchinechi Fernandes

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 26/06/2009

---

Tudo vem Dele que “já está no meio de nós”. Procurar-se é procurá-Lo e procurá-Lo é encontrar-se.

(Adélia Prado).

Para meus amados Davi e Patrícia.

Para minha família: Zilma, Leo e Edu; Zelma, Zaire, Ângelo e Romero.

Para meus amigos queridos: Rose, Ana Paula, Carlos Rogério, Thalles e Michelle.

Para Marçal de Souza, Elizete Sena, Eliége Brandão, Salete Menezes, Elny Banks e Kátia Branco.

Para os pacientes e voluntários que participaram da pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Profa. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes: dedicação, incentivo, atenção, paciência e competência na orientação deste estudo.

Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo, pelo importante trabalho de co-orientação.

Prof. Dr. Maurício Levy-Neto, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Dra. Roseneide Conde, indispensável apoio durante a realização das tipagens HLA-DR.

Cleide Moreira Silva, fundamental na análise estatística.

Todos os profissionais do Centro de Hematologia e Hemoterapia do HC/FCM-UNICAMP, pelo auxílio durante as coletas de sangue.

Marcelo Albuquerque e Mônica Barradas, valiosa ajuda durante a digitação e revisão dos dados.

Todos os profissionais que fazem a Disciplina de Reumatologia da FCM-UNICAMP.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

**1.INTRODUÇÃO** (pg. 1).

1.1.Generalidades (pg. 1).

1.2.Etiopatogenia das vasculites (pg. 6).

1.3.A resposta imune-inflamatória (pg. 12).

1.4.Poliarterite nodosa (pg. 14).

1.5.Poliangiíte microscópica (pg. 19).

1.6.Índices de atividade e gravidade de doença (pg. 22).

1.7.Complexo maior de histocompatibilidade (pg. 24).

1.8.Alelos HLA, PAN e poliangiíte microscópica (pg. 28).

**2.OBJETIVOS** (pg. 37).

**3.CASUÍSTICA E MÉTODOS** (pg. 38).

3.1.Seleção dos pacientes (pg. 38).

3.2.Grupo controle (pg. 41).

3.3.Métodos (pg. 42).

3.3.1.Extração de DNA (pg. 42).

3.3.1.1.Obtenção dos leucócitos (pg. 42).

3.3.1.2.Lise dos leucócitos e precipitação do DNA (pg. 42).

3.3.2.Tipagem do HLA-DR pela técnica PCR-SSP de baixa resolução (pg. 43).

3.3.3.Análise estatística (pg. 45).

**4.RESULTADOS** (pg. 46).

4.1.Achados demográficos, clínicos e laboratoriais (pg. 46).

4.2.Alelos HLA-DR (pg. 50).

**5.DISSCUSSÃO** (pg. 58).

**6.CONCLUSÕES** (pg. 66).

**7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** (pg. 67).

**8.ANEXOS** (pg. 79).

## LISTA DE ABREVIATURAS

AASV = *ANCA associated systemic vasculitis*

ACR = *American College of Rheumatology*

ANCA = anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos

BVAS = *Birmingham Vasculitis Activity Score*

CHCC = *Chapel Hill Consensus Conference*

CPH = complexo principal de histocompatibilidade

EUA = Estados Unidos da América

EULAR = *European league against rheumatism*

FFS = *Five-Factors Score*

HAS = hipertensão arterial sistêmica

HBV = vírus da hepatite B

HCV = vírus da hepatite C

HLA = *human leukocyte antigen*

IL = interleucina

LES = lúpus eritematoso sistêmico

MPO = mieloperoxidase

NP = neuropatia periférica

PAN = poliarterite nodosa

PMNs = polimorfonucleares

PR3 = proteinase-3

SNC = sistema nervoso central

TGI = trato gastrintestinal

TNF = fator de necrose tumoral

VHS = velocidade de hemossedimentação

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características demográficas dos casos e controles (pg.46).

TABELA 2: Manifestações clínicas, BVAS e FFS dos casos (%) (pg. 48).

TABELA 3: Alelos HLA-DR nos casos e controles (%) (pg. 50).

TABELA 4: Alelos HLA-DR no grupo total de casos de acordo com o BVAS e nos controles (pg. 51).

TABELA 5: Alelos HLA-DR no grupo total de casos de acordo com o FFS e nos controles (pg. 52).

TABELA 6: Alelos HLA-DR e manifestações clínicas gastrintestinais/renais (ausentes/presentes) no grupo total de casos (n=29) (pg. 53).

TABELA 7: Alelos HLA-DR no grupo de casos com poliangiíte microscópica de acordo com o BVAS e no grupo controle (pg. 55).

TABELA 8: Alelos HLA-DR no grupo de casos com poliangiíte microscópica de acordo com o FFS e no grupo controle (pg. 56).

TABELA 9: Alelos HLA-DR no grupo de pacientes com poliangiíte microscópica e acometimento renal (ausente/presente) (n=10) (pg. 57).

TABELA 10: Alelos HLA-DR nos pacientes com poliangiíte microscópica de acordo com o ANCA (presença/ausência) (n=8) (pg. 57).

## RESUMO

O presente estudo avaliou a frequência dos alelos HLA-DR em um grupo de 29 pacientes brasileiros caucasóides com PAN ou poliangiíte microscópica e investigou uma possível relação entre os alelos HLA-DR, os índices de atividade e gravidade e as manifestações clínicas de doença. O diagnóstico de cada paciente baseou-se nos critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) para a PAN e da Conferência Internacional de Consenso de Chapel Hill (CHCC) para poliangiíte microscópica. A atividade e a gravidade da doença foram mensuradas retrospectivamente, por ocasião do diagnóstico, utilizando-se, respectivamente, o *Birmingham Vasculitis Activity Score* (BVAS) e o *Five-Factors Score* (FFS). De acordo com o BVAS, os pacientes foram divididos em dois grupos: aqueles com BVAS < 22 e outro com BVAS ≥ 22. De acordo com o FFS, dois grupos foram definidos: 0, quando nenhum fator de pior prognóstico foi notado e ≥ 1 quando 1 ou mais fatores estavam presentes. As manifestações clínicas presentes por ocasião do diagnóstico foram avaliadas de acordo com o sistema orgânico acometido. Cinquenta e nove indivíduos caucasóides, saudáveis, da mesma população, formaram o grupo controle. A tipagem dos alelos HLA-DR foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se sequências específicas de *primers* DR de baixa resolução. No grupo total de casos, encontrou-se uma maior frequência estatisticamente significativa de HLA-DRB1\*16 (p=0.023) e DRB4\*01 (p=0.048) nos pacientes com BVAS ≥ 22. Os pacientes com FFS=0 apresentaram uma maior frequência estatisticamente significativa de HLA-DRB1\*03. A frequência de HLA-DRB1\*11 e/ou B1\*12 (p=0.046), B1\*13 (p=0.021) e B3 (p=0.008) foi significativamente maior nos pacientes com envolvimento do trato gastrointestinal e a de DRB1\*15 e/ou DRB1\*16 (p=0.035) e B5 (p=0.035) nos pacientes com acometimento renal. Nossos resultados sugerem que os alelos HLA-DRB1\*15/B1\*16, B4\*01, B1\*03, B1\*11/B1\*12, B1\*13, B3 e B5 podem influenciar a expressão clínica da PAN e da poliangiíte microscópica na nossa população.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the frequency and clinical associations of HLA-DR alleles in Brazilian Caucasian patients with polyarteritis nodosa (PAN) or microscopic polyangiitis (MPA). We evaluated 29 Caucasian patients with vasculitis classified as PAN or MPA according to the American College of Rheumatology (ACR) 1990 Criteria and Chapel Hill Consensus Conference (CHCC) nomenclature for vasculitis. HLA-DR alleles were typed using polymerase chain reaction-amplified DNA, hybridized with sequence-specific low resolution primers. DNA obtained from 59 Caucasian healthy blood donors were used as control. In order to evaluate if a specific HLA may have influence on the clinical profile of those diseases, we also divided the patients according to Birmingham vasculitis score (BVAS) and Five-Factors Score (FFS) at the time of diagnosis. Increased frequency of HLA-DRB1\*16 ( $p=0.023$ ) and DRB4\*01 ( $p=0.048$ ) was found in patients with higher disease activity at the time of diagnosis ( $BVAS \geq 22$ ). Patients with less severe disease ( $FFS=0$ ) had a higher frequency of HLA-DRB1\*03 ( $p=0.011$ ). Patients with gastrointestinal tract involvement had significantly increased frequency of HLA-DRB1\*11 or B1\*12 ( $p=0.046$ ), B1\*13 ( $p=0.021$ ) and B3 ( $p=0.008$ ). In contrast, patients with renal disease, had higher frequency of DRB1\*15 or DRB1\*16 ( $p=0.035$ ) and B5 ( $p=0.035$ ). Our results suggest that HLA-DR alleles may influence PAN and MPA clinical expression and outcome.

# **1.INTRODUÇÃO**

## **1.1.GENERALIDADES**

As vasculites sistêmicas compreendem um grupo diverso de doenças cujo denominador comum é a agressão inflamatória à parede vascular. As manifestações clínicas são variadas e dependentes de fenômenos isquêmicos ou hemorrágicos por envolvimento de vasos, principalmente artérias, de vários calibres e em diferentes localizações.

As primeiras descrições de casos datam do início do século XIX sobre a vasculite atualmente denominada púrpura de Henoch-Schönlein. Também são eventos iniciais importantes os trabalhos de Rokitansky (1852) e de Kussmaul e Maier (1866) “apud” Lightfoot Jr. (1994) com os primeiros relatos sobre a poliarterite nodosa (PAN). Vários outros relatos fundamentais contribuíram para uma melhor caracterização das vasculites sistêmicas, destacando-se os trabalhos de Takayasu (1908), Behçet (1937), Wegener (1939) e Churg e Strauss (1951) “apud” Lightfoot Jr. (1994).

Mais recentemente, destacou-se o fato de doenças sistêmicas bem definidas eventualmente apresentarem vasculite como fenômeno secundário, tais como neoplasias, endocardite bacteriana, infecção pelo vírus HIV e até mesmo hipercolesterolemia (Longley et al., 1986; Calabrese, 1989; Turakhia e Khan, 1990; Blanco et al., 1998; Garcia-Porrúa e Gonzales-Gay, 1999).

Com um número cada vez maior de doenças sendo descritas entre as vasculites sistêmicas, tornou-se necessária a criação de um sistema de classificação para distinguir as diversas síndromes. Algumas tentativas de agrupar essas doenças de acordo com suas características clínicas, calibre do vaso

acometido e tipo histológico já foram feitas, mas até hoje nenhuma satisfaz plenamente e todas são passíveis de críticas e correções.

Vários fatores são responsáveis pelas dificuldades encontradas na classificação das vasculites sistêmicas primárias, sendo o desconhecimento dos reais fatores etiopatogênicos dessas doenças o mais relevante. Outro ponto a considerar é a ausência de um exame com especificidade diagnóstica, o que inviabiliza a classificação por esse meio; sempre é necessário dispor de um conjunto de dados clínicos, laboratoriais, angiográficos e histopatológicos para se definir com relativa precisão uma síndrome vasculítica (Haubitz, 2007).

Como as lesões vasculares podem ocorrer em vasos de qualquer calibre, ou seja, desde a aorta e seus ramos até as arteríolas e vênulas capilares, esses dados são utilizados para compor uma das classificações admitidas para as vasculites sistêmicas, separando-as em predominantemente de vasos de grande, médio ou pequeno calibre (Lightfoot Jr., 1994). Outro critério classifica as vasculites sistêmicas em primárias e secundárias, diferenciando-se os dois tipos pelo fato das secundárias serem apenas manifestações clínicas de uma doença definida, como as vasculites observadas nas doenças difusas do tecido conjuntivo, tais como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a artrite reumatóide (Quadro 1) (Lie, 1994).

Em 1990, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) realizou um estudo multicêntrico com a finalidade de verificar a sensibilidade e a especificidade dos achados clínicos, laboratoriais, angiográficos e histopatológicos de cada tipo de vasculite sistêmica primária. A partir de então, pela primeira vez, obteve-se

critérios classificatórios para diferenciar os tipos de vasculites sistêmicas primárias (Bloch et al., 1990).

Apesar dos critérios do ACR continuarem amplamente utilizados, decorridos alguns anos, observou-se que apresentavam algumas falhas, sendo uma delas o não reconhecimento da poliangiíte microscópica como entidade distinta da poliarterite nodosa; criou-se, então, a nomenclatura de Chapel Hill para as vasculites sistêmicas primárias, com definição de cada uma delas (*Chapel Hill Consensus Conference*), (Quadro 2) (Jennette et al., 1994).

## Quadro 1

### Classificação das vasculites sistêmicas.

#### **VASCULITES PRIMÁRIAS**

##### **De grandes e médios vasos:**

Arterite de Takayasu

Arterite de células gigantes (temporal)

Angiíte isolada do sistema nervoso central

##### **Predominantemente de médios e pequenos vasos:**

Poliarterite nodosa

Síndrome de Churg-Strauss

Granulomatose de Wegener

##### **Predominantemente de pequenos vasos:**

Poliangiíte microscópica

Síndrome de Henoch-Schönlein

Angiíte leucocitoclástica cutânea

##### **Miscelânea:**

Doença de Kawasaki

Doença de Behçet

#### **VASCULITES SECUNDÁRIAS**

Infecções

Doenças difusas do tecido conjuntivo

Uso de drogas

Neoplasias

Pós-transplante de órgãos

Adaptado de Lie (1994).

## Quadro 2

Definição das vasculites sistêmicas primárias - Nomenclatura de Chapel Hill.

### ARTERITE DE GRANDES VASOS

-**Arterite de células gigantes:** arterite granulomatosa da aorta e ramos com predileção para artéria temporal. Afeta indivíduos acima de 50 anos. Associa-se com polimialgia reumática.

-**Arterite de Takayasu:** inflamação granulomatosa da aorta e ramos. Afeta indivíduos com idade inferior a 50 anos.

### ARTERITE DE VASOS DE MÉDIO CALIBRE

-**Poliarterite nodosa:** inflamação necrosante de artérias de médio e pequeno calibres. Ausência de glomerulonefrite e vasculite em arteríolas, capilares e/ou vênulas.

-**Doença de Kawasaki:** Associa-se com a síndrome mucocutânea. Afeta predominantemente crianças e pode apresentar coronarite com aneurismas.

### VASCULITES DE PEQUENOS VASOS

-**Poliangiíte microscópica:** vasculite necrosante com pouco ou nenhum depósito imune. Afeta pequenos vasos inclusive capilares, arteríolas e vênulas. Vasculite em artérias de médio calibre pode estar presente. Glomerulonefrite é comum e capilarite pulmonar pode ocorrer.

-**Granulomatose de Wegener:** Inflamação granulomatosa envolvendo o trato respiratório. Vasculite necrosante de vasos de pequeno e médio calibres. Arteríolas e vênulas são afetadas. Glomerulonefrite necrosante é comum.

-**Síndrome de Churg-Strauss:** vasculite necrosante granulomatosa de vasos de pequeno e médio calibres. Processo inflamatório rico em eosinófilos que afeta o sistema respiratório. Associa-se com asma e eosinofilia.

-**Púrpura de Henoch-Schönlein:** vasculite com depósitos de IgA em pequenos vasos. Envolve pele, intestino e glomérulos. Está associada com artrite.

-**Vasculite crioglobulinêmica:** vasculite de pequenos vasos com depósito imune de crioglobulinas.

-**Vasculite leucocitoclástica cutânea:** vasculite cutânea isolada.

(Jennette et al., 1994).

## 1.2. ETIOPATOGENIA DAS VASCULITES SISTÊMICAS PRIMÁRIAS

Embora a etiopatogenia das vasculites sistêmicas primárias não se encontre totalmente elucidada, no seu desencadeamento é nítida a participação do sistema imunológico. A resposta terapêutica a imunossuppressores bem como o achado de infiltrado inflamatório crônico na parede vascular sustentam a hipótese da participação imunológica (Leib et al., 1981; Fernandes, 1993).

Infelizmente, o estímulo inicial que desencadeia e perpetua a resposta auto-imune responsável pela lesão vascular é usualmente desconhecido. A demonstração do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBSAg) e mais raramente do vírus C, leva à suposição de que estes agentes têm algum papel na etiopatogenia de alguns casos de PAN (Baker et al., 1972; Trepo et al., 1974; Fernandes, 1993; Hunder, 1993; Vassilopoulos et al., 2003). Esta hipótese ganha mais importância quando se observa a aparente diferença na evolução dos casos de PAN com hepatite viral tratados com drogas antivirais (Guillevin et al., 1996). Outros agentes virais, tais como o parvovírus B19 (Lehmann et al., 2003) e o citomegalovírus (Fernandes et al., 1999), também são apontados como eventuais agentes envolvidos no desencadeamento de alguns tipos de vasculite sistêmica primária, destacando-se a granulomatose de Wegener, a arterite de células gigantes e a PAN.

Além dos agentes virais, outros agentes infecciosos têm sido apontados como fatores desencadeantes, tais como a possível participação dos estreptococos do grupo A em casos de PAN na infância (Fink, 1991).

É importante observar, no entanto, que poucos indivíduos com vasculite sistêmica primária apresentam evidências de infecção; além disso, são raros os indivíduos expostos a esses agentes infecciosos que desenvolvem vasculite, o

que sugere que outros fatores, ambientais ou genéticos, devem participar na etiopatogênese (Sundy e Haynes, 1995).

A partir do estímulo inicial, vários mecanismos fisiopatológicos podem ser desencadeados, conduzindo ao dano tecidual nos pacientes com vasculite. Embora cada um deles possa ser analisado separadamente, é importante notar que dois ou mais mecanismos podem atuar simultaneamente. Os seguintes mecanismos podem ter relevância fisiopatológica (Cupps, 1993; Sundy e Haynes, 1995):

- Formação de imunocomplexos:

O papel dos imunocomplexos na patogênese das vasculites é estudado desde a demonstração da deposição destes na parede vascular (Sundy e Haynes, 1995). A formação de imunocomplexos é um fenômeno normal durante a resposta imune mediada por anticorpos; só raramente este aspecto resulta em doença, pois há um efetivo sistema de *clearance* dos imunocomplexos, cuja ação é facilitada pela ativação do complemento. Normalmente, eritrócitos e monócitos/macrófagos, através de seus receptores para o complemento, de forma eficiente capturam e removem os imunocomplexos circulantes. Qualquer prejuízo neste sistema pode ser deletério para o organismo. Uma evidência neste sentido é a maior frequência de vasculite em indivíduos com deficiências genéticas de componentes do complemento (Ross e Densen, 1984). A depleção adquirida de frações do complemento, que pode ocorrer como resultado de uma maior e/ou persistente produção antigênica, também pode contribuir para uma remoção inadequada dos complexos imunes; é o que ocorre, por exemplo, em alguns pacientes com PAN associada à infecção crônica pelo vírus da hepatite B. Assim,

uma vez em excesso, os imunocomplexos depositam-se na parede vascular, iniciando a agressão inflamatória (Cupps, 1993; Sundry e Haynes, 1995). É possível, no entanto, que os imunocomplexos também sejam formados localmente, em vez de serem decorrentes apenas de deposição a partir da circulação (Leavitt e Fauci, 1986). Quando presentes na parede vascular, os imunocomplexos estimulam a resposta inflamatória através de dois mecanismos principais: ativando o sistema complemento e interagindo diretamente com receptores Fc da membrana de monócitos e granulócitos, o que leva à liberação de citocinas e enzimas proinflamatórias (Sundry e Haynes, 1995).

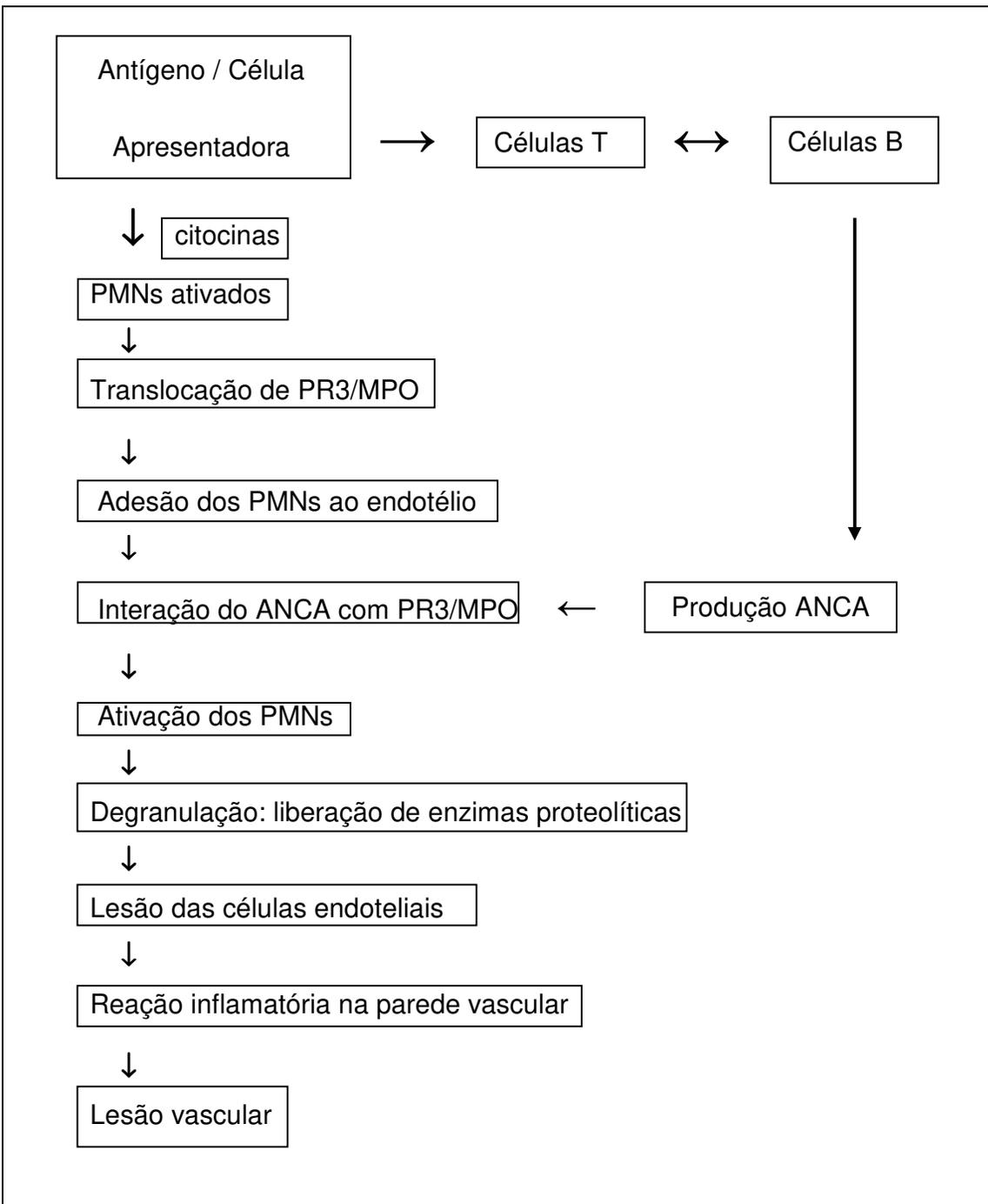
- Ação de anticorpos:

Atualmente, acredita-se que têm importância no desenvolvimento de alguns casos de vasculite sistêmica primária, os anticorpos dirigidos contra enzimas lisossômicas de neutrófilos (ANCA) e os antiendoteliais (Sundry e Haynes, 1995; Russel e Specks, 2001; Haubitz, 2007). Os anticorpos antilissossomais são dirigidos contra enzimas originariamente localizadas no citoplasma de neutrófilos, mais especificamente nos grânulos azurófilos. Detectados por imunofluorescência indireta, duas especificidades predominantes são reconhecidas: perinuclear (p-ANCA) e citoplasmática (c-ANCA), dirigidas predominantemente contra as enzimas mieloperoxidase (MPO) e proteinase-3 (PR3), respectivamente. Estes anticorpos são encontrados principalmente em portadores de vasculites sistêmicas primárias de pequenos vasos, especialmente em casos de granulomatose de Wegener, poliangiíte microscópica e síndrome de Churg-Strauss (Schultz e Tozman, 1995; Russel e Specks, 2001; Haubitz, 2007). Em condições normais, a MPO e a PR3 são enzimas de localização intracelular,

sendo assim inacessíveis aos anticorpos extracelulares. Nas vasculites sistêmicas primárias associadas ao ANCA (AASV), no entanto, acredita-se que estas enzimas passam a ser expressas na superfície celular a partir da ação inicial de citocinas, particularmente o TNF- $\alpha$ ; o ANCA pode então interagir com os neutrófilos, ativando-os, aumentando sua aderência à parede vascular e induzindo degranulação, o que resultará em dano tecidual (Schultz e Tozman, 1995; Edgar, 1996; Russel e Specks, 2001). Acredita-se também que a produção do ANCA pode ser o resultado da interação entre células T e B ativadas (Day et al., 2003; Specks, 2002) (Figura 1). Por sua vez, os anticorpos antiendoteliais têm sido encontrados em diversas síndromes vasculíticas, em alguns casos correlacionando-se com a atividade da doença. Os mecanismos propostos pelos quais estes anticorpos podem levar ao dano vascular são os da citotoxicidade, ativação do complemento, aumento da trombogênese intravascular e o recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação vascular (Haynes, 1992; Cupps, 1993).

Figura 1

Sequência hipotética de eventos da ativação de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) e lesão vascular pelos anticorpos antineutrófilicos (ANCA).



Adaptado de Specks (2002).

- Resposta imune celular:

A resposta imune mediada por células é mais um provável mecanismo envolvido na etiopatogênese das vasculites. Diversos estudos têm caracterizado o infiltrado celular nas lesões inflamatórias. Existem casos com infiltração predominantemente de macrófagos e linfócitos CD4+ e outros com células T CD8+ e células B. É importante ressaltar o encontro de receptores para citocinas na maioria destas células (Sundy e Haynes, 1995). Recentemente, a participação de células dendríticas, localizadas na camada adventícia de artérias de grande e médio calibres, tem sido cogitada na reação inflamatória dos tipos de vasculite sistêmica primária que afetam artérias desses calibres, tais como a arterite de Takayasu e a arterite de células gigantes. Acredita-se, nestes casos, que as células dendríticas contribuem para o desencadeamento da resposta imune mediada por células T através da sua função de apresentação antigênica (Krupa et al., 2002; Weyand e Goronzy, 2003).

De acordo com o exposto acima, percebe-se que a reação inflamatória encontrada nas vasculites sistêmicas primárias é o resultado final de uma série de acontecimentos que têm como aspecto fundamental a interação entre os diversos componentes do sistema imune (Sundy e Haynes, 1995; Weyand e Goronzy, 2003).

### **1.3.RESPOSTA IMUNE-INFLAMATÓRIA**

Uma vez em contato com o organismo, o estímulo que desencadeia a resposta imune-inflamatória ativa tanto os leucócitos quanto as células endoteliais; inicia-se então a interação entre estas células, acreditando-se ser este evento primordial para a amplificação da inflamação (Varani et al., 1994; Mendonça, 1995). As células endoteliais e os leucócitos interagem mutuamente através de três fenômenos que, apesar de analisados isoladamente, na verdade estão inter-relacionados; são eles:

- Expressão de moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade:

Durante a reação inflamatória, leucócitos e células endoteliais podem expressar em sua superfície antígenos classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH). Através deste fenômeno, participam da apresentação de antígenos aos linfócitos T. Por sua vez, a expressão destas moléculas é um evento induzido pela ação de células T ativadas e de citocinas (Cupps, 1993; Mendonça, 1995).

- Expressão de moléculas de adesão:

Os estímulos inflamatórios, incluindo-se aqui antígenos e citocinas, induzem a expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais e leucócitos. Por intermédio destas moléculas, ocorre a adesão de leucócitos à parede vascular e posterior migração destes do meio intravascular para os tecidos (Cupps, 1993; Sundry e Haynes, 1995; Russel e Specks, 2001).

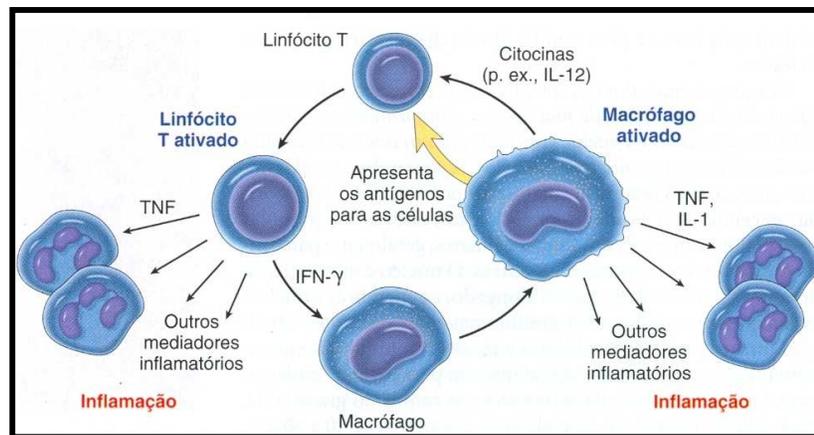
- Produção de citocinas:

As citocinas são peptídeos mediadores da comunicação intercelular. Durante a reação inflamatória, leucócitos e células endoteliais produzem diversas citocinas que têm inúmeras ações, executadas por intermédio da ligação a receptores

celulares específicos (Barrera et al., 1996). Atualmente, as citocinas são organizadas em algumas famílias: interferons, interleucinas, fatores estimulantes de colônias e fatores de necrose tumoral. Vários efeitos biológicos destas moléculas desempenham importantes funções na patogênese das vasculites sistêmicas primárias, destacando-se o papel das interleucinas 1, 2, 6 e 8 que atuam como fatores de indução da diferenciação, proliferação e ativação dos leucócitos e como fatores quimiotáticos, fundamental para a migração e o acúmulo de células nos locais de inflamação, e também o do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) produzido por monócitos, macrófagos e células endoteliais e que é responsável pela indução de moléculas de adesão no endotélio. As citocinas, portanto, participam dos diversos estágios da inflamação e da resposta imune, sendo fundamentais na expressão das doenças inflamatórias (Sneller e Fauci, 1997; Freire, 2000; Freire et al., 2004) (Figura 2).

Figura 2

Citocinas e resposta inflamatória.



<http://www.google.com.br>, março de 2009.

#### 1.4.POLIARTERITE NODOSA

A poliarterite nodosa (PAN) é definida como uma vasculite necrosante de artérias de médio e pequeno calibres (Lightfoot Jr. et al., 1990). É uma doença incomum, sem predomínio em qualquer grupo racial, com maior prevalência em adultos, principalmente do sexo masculino, entre a terceira e quinta décadas de vida (Hunder, 1993; Conn, 1994).

O início da doença geralmente é insidioso. Sintomas constitucionais como astenia, emagrecimento e febre estão quase sempre presentes. Mialgia difusa e fraqueza muscular também são frequentes (Guillevin et al., 1991; Lhote et al., 1998). As lesões cutâneas são inespecíficas; as mais encontradas são lesões nodulares, úlceras e livedo reticular, sendo mais raros fenômeno de Raynaud e necrose digital (Hunder, 1993; Conn, 1994). As manifestações articulares são comuns e representadas especialmente por artralgia e mais raramente artrite; esta, quando presente, geralmente é transitória, não erosiva e não deformante (Jennete et al., 2001; Guillevin et al., 1985; Hunder, 1993; Conn, 1994).

O envolvimento neurológico mais frequente é a neuropatia periférica (NP), que pode ser encontrada em cerca de 70% dos casos, manifestando-se por mononeurite múltipla ou polineuropatia. Por sua vez, a ocorrência de neuropatia de pares cranianos é mais rara, sendo relatada em 2% dos casos (Guillevin et al., 1992). O acometimento do sistema nervoso central (SNC) é infrequente, mas podem ocorrer acidentes vasculares cerebrais e convulsões (Guillevin et al., 1985; Fernandes, 1993; Hunder, 1993; Conn, 1994).

O envolvimento de artérias renais intraparenquimatosas geralmente se expressa clinicamente por hipertensão arterial sistêmica, podendo acarretar insuficiência renal (Hunder, 1993; Conn, 1994).

As manifestações gastrintestinais são variáveis e mais frequentemente surgem queixas de dores abdominais. Os casos mais graves podem evoluir com perfuração de alças intestinais e/ou hemorragia digestiva, episódios com altíssimas taxas de mortalidade – de 75 a 100% desses casos (Karp et al., 1988; Guillevin et al., 1992). Manifestações clínicas de acometimento hepático são em geral pouco expressivas; existe, entretanto, a possibilidade de se encontrar esteatose, hepatite crônica e/ou cirrose, especialmente nos pacientes com hepatite B (Guillevin et al., 1985; Guillevin et al., 1991; Fernandes, 1993; Hunder, 1993; Conn, 1994).

Outras manifestações menos comuns são: dor testicular, que está presente com maior frequência nos casos de PAN relacionada à presença do vírus da hepatite B (Guillevin et al., 1991), sintomas de isquemia miocárdica secundários à vasculite coronariana e alterações oculares tais como episclerite, iridociclite e oclusão da artéria retiniana central (Fernandes, 1993; Hunder, 1993; Conn, 1994).

Os exames complementares podem revelar alterações que traduzem a existência de uma atividade inflamatória e/ou outros achados inespecíficos que indicam envolvimento nos diversos órgãos. Para a confirmação diagnóstica é necessária a presença de achados angiográficos e/ou histopatológicos sugestivos da doença (Lightfoot Jr. et al., 1990; Hunder, 1993; Conn, 1994; Fernandes et al., 1997).

A angiografia pode revelar múltiplos microaneurismas especialmente nas bifurcações arteriais; áreas de estenose, irregularidades no trajeto vascular e locais de sangramento são outros possíveis achados, sendo as artérias intraparenquimatosas renais, hepáticas e mesentéricas as mais frequentemente

acometidas (Lightfoot Jr. et al., 1990; Hunder, 1993; Conn, 1994; Fernandes et al., 1995; Guillevin et al., 1991).

Os locais preferenciais para a realização de biópsia são pele, músculo e nervo. Os achados histopatológicos revelam infiltrado inflamatório constituído por polimorfonucleares e mononucleares, necrose fibrinóide, ruptura da lâmina elástica e proliferação endotelial. Lesões em diferentes estágios de evolução podem estar presentes na mesma amostra de tecido. Nas lesões agudas, o infiltrado celular é predominantemente constituído por polimorfonucleares; posteriormente, essas células são substituídas por linfócitos e monócitos (Lightfoot Jr. et al., 1990; Fernandes, 1993; Hunder, 1993; Conn, 1994).

Em 1990, o ACR estabeleceu critérios classificatórios para a PAN. Estes critérios foram baseados em dados clínicos, angiográficos e histopatológicos de 118 pacientes com o diagnóstico definido de PAN comparados com 689 pacientes com outras vasculites sistêmicas primárias. O preenchimento desses critérios revelou uma sensibilidade de 82.2% e especificidade de 86.6%. Uma vasculite sistêmica primária será classificada como PAN com o preenchimento de no mínimo três dos dez critérios propostos (Quadro 3). Devido à inespecificidade de suas manifestações clínicas, no diagnóstico diferencial devem ser sempre colocadas diversas doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas (Lightfoot Jr. et al., 1990).

No tratamento da PAN utiliza-se corticosteróides geralmente em altas doses e imunossupressores como a ciclofosfamida e a azatioprina. Pacientes que têm hepatite B e/ou C devem ser tratados com a administração de drogas antivirais, tais como a lamivudina e o interferon- $\alpha$ , e corticosteróides, reservando-se a

ciclofosfamida apenas para os casos refratários (Lightfoot Jr. et al., 1990; Fernandes, 1993; Hunder, 1993; Conn, 1994; Guillevin et al., 1996; Lhote et al., 1998; Guillevin, 2004). O benefício do uso de agentes biológicos no manejo da PAN ainda não está comprovado, embora existam relatos de casos em que o controle da doença refratária foi alcançado com o emprego destes (Al-Bishri et al., 2005).

O prognóstico desta doença é dependente da extensão do envolvimento sistêmico e a mortalidade diretamente relacionada com os comprometimentos gastrintestinal, renal, do SNC e miocardiopatia, fatores de pior prognóstico denominados de FFS (*Five-Factors Score*) (Guillevin et al., 1996).

### Quadro 3

#### Critérios classificatórios do ACR para PAN.

1 - Emagrecimento superior a 4 kg
-----------------------------------

- 2 - Livedo reticular
- 3 - Dor testicular
- 4 - Mialgia difusa, fraqueza muscular ou dor à compressão das panturrilhas
- 5 - Neuropatia periférica
- 6 - Pressão arterial diastólica superior a 90 mmHg
- 7 - Elevação de uréia (acima de 40 mg/dl) ou creatinina (acima de 1,5 mg/dl)
- 8 - Presença de HBSAg ou Anti-HBS
- 9 - Anormalidade arteriográfica (aneurismas ou estenoses de artérias viscerais, excluindo-se aterosclerose, fibrodisplasia muscular e outras arteriopatias não inflamatórias)
- 10 - Alterações histopatológicas em artérias de médio e/ou pequeno calibres (presença de polimorfonucleares associados ou não a mononucleares na parede arterial)

Lightfoot Jr. et al. (1990).

### **1.5.POLIANGÍTE MICROSCÓPICA**

A poliangíte microscópica foi descrita em 1948 como uma forma particular, microscópica, da PAN que exibia a presença de glomerulonefrite crescêntica como um elemento característico. Na década de 80, com a descrição do ANCA,

tornou-se evidente que esse anticorpo era raro na PAN sem glomerulonefrite, mas comum na variedade microscópica. Como essa forma não foi inicialmente considerada uma entidade distinta da PAN, não foi incluída na classificação de 1990 do ACR (Segelmark e Selga, 2007). Apenas em 1994, foi reconhecida como uma entidade distinta da PAN, através do consenso de nomenclatura de Chapel Hill. Atualmente, é definida como uma vasculite necrosante sistêmica primária, não-granulomatosa, pauci-imune que afeta preferencialmente vasos de pequeno calibre (arteríolas, capilares e vênulas) (Guillevin et al., 1999). Diferencia-se da PAN principalmente pela presença de púrpura, capilarite pulmonar, glomerulonefrite necrosante segmentar e positividade para o ANCA. Embora não haja estudos epidemiológicos, sua incidência parece ser maior do que a descrita para a PAN. Apresenta leve predomínio no sexo masculino com pico de incidência em torno dos cinquenta anos de idade (Guillevin et al., 1999; Agard et al., 2003).

Queixas gerais constitucionais como febre, perda de peso e astenia estão presentes em mais de 70% dos casos. Mialgia difusa, artralgia e artrite estão presentes em 50-70% dos pacientes. Lesões cutâneas como púrpura estão presentes em 40-60% dos casos (Guillevin et al., 1999; Agard et al., 2003).

O comprometimento gastrointestinal é responsável por alterações tais como dor abdominal (30-60%) e/ou sangramento (30%) (Guillevin et al., 1999; Agard et al., 2003). A NP pode ocorrer em até metade dos casos. O envolvimento do SNC ocorre em cerca de 10% dos casos (Guillevin et al., 1999).

O envolvimento renal na poliangiíte microscópica é observado em 80% dos casos e pode expressar-se através de glomerulonefrite necrosante pauci-imune com alterações de sedimento urinário tais como hematúria microscópica e/ou

proteinúria; a maioria dos pacientes apresenta algum grau de insuficiência renal, às vezes diálise-dependente (Guillevin et al., 1999).

O comprometimento pulmonar é evidente em cerca de um terço dos casos, podendo ocorrer hemorragia alveolar evidenciada clinicamente por dispnéia, tosse e/ou hemoptise (Guillevin et al., 1999; Agard et al., 2003).

ANCA predominantemente de padrão perinuclear (p-ANCA) está presente em cerca de 3/4 dos pacientes. Quando investigado pelo método de ELISA, a maioria dos casos apresenta anticorpos anti-MPO, mas anti-PR3 também pode ser encontrado (Wiik, 2001); no entanto, os anticorpos ANCA não são um achado específico e podem ser encontrados, em menor frequência, em outras doenças inflamatórias sistêmicas, tais como as doenças inflamatórias intestinais (Guillevin et al., 1999).

No tratamento, utiliza-se glicocorticóides por via oral ou como pulsoterapia nos casos graves. A ciclofosfamida ainda é a droga de escolha nos casos com comprometimento visceral importante, tais como cardiopulmonar, renal, gastrintestinal e/ou nervoso central e para os casos não-responsivos à corticoterapia isolada. A azatioprina parece ser menos eficaz que a ciclofosfamida no tratamento inicial da doença, mas pode ser utilizada na fase de manutenção de remissão induzida pela ciclofosfamida (Guillevin et al., 2003). A ação do agente biológico anti-TNF- $\alpha$  infliximabe foi investigada em um estudo não controlado com pequeno número de pacientes, em combinação com a terapia convencional, com bons resultados na indução de remissão (Booth et al., 2004). A eficácia de outro agente biológico anti-CD-20, o rituximabe, no tratamento da poliangiíte microscópica também vem sendo avaliada, considerando-se a hipótese de que a

depleção de células B pode acarretar eliminação da produção do ANCA, anticorpo provavelmente envolvido na patogênese da doença. Estes estudos abrem novos caminhos quanto às possibilidades terapêuticas, já que a depleção de linfócitos B parece ser um mecanismo efetivo de indução e controle da resposta inflamatória (Langford e Sneller, 2003; Keogh et al., 2005; Smith et al., 2006; Jayne, 2008).

A poliangiíte microscópica apresenta recidivas em cerca de um terço dos casos. As causas de óbito geralmente são devidas à vasculite renal e/ou pulmonar e/ou às infecções secundárias ao tratamento com altas doses de corticosteróides associados ou não a imunossupressores. Idade acima de 50 anos e aumento de creatinina por ocasião do diagnóstico são fatores de pior prognóstico (Guillevin et al., 1999; Agard et al., 2003; Guillevin et al., 2003).

## **1.6.ÍNDICES DE ATIVIDADE E GRAVIDADE DE DOENÇA**

As avaliações da atividade e da gravidade de doença são aspectos importantes no acompanhamento clínico e monitorização da resposta terapêutica dos casos de vasculites sistêmicas primárias.

Devido à necessidade de padronização e quantificação objetiva da atividade de doença para análises comparativas de diversas séries de pacientes, foi criado o *Birmingham Vasculitis Activity Score* (BVAS) desenvolvido na Universidade de Birmingham, Inglaterra, em 1994 (Luqmani et al., 1994). O BVAS pode ser aplicado em todos os tipos de vasculites sistêmicas primárias e considera a presença ou não de alterações clínicas relacionadas à doença em nove sistemas orgânicos e sua pontuação vai de zero a 63 (Anexo 1). Em um estudo realizado com 278 pacientes com diagnóstico de PAN, poliangiíte microscópica ou síndrome de Churg-Strauss, Gayraud et al. (2001) encontraram uma correlação positiva entre um BVAS > 23 por ocasião do diagnóstico e uma maior mortalidade; aproximadamente 25% desses casos evoluíram para o óbito nos primeiros dois anos após o diagnóstico da doença.

Não há até o momento um instrumento ideal de avaliação de gravidade de doença. Na PAN e na poliangiíte microscópica pode-se aplicar um *score*, o FFS (*Five-Factors Score*) desenvolvido pelo *French Vasculitis Study Group* (Guillevin et al., 1996). É utilizado nos casos de PAN e poliangiíte microscópica por ocasião do início do tratamento, sendo útil na identificação dos pacientes que vão requerer um tratamento inicial mais agressivo. O FFS considera a presença ou não de cinco achados clínicos relacionados com o aumento nas taxas de mortalidade. São eles: 1 - elevação da creatinina sérica (> 1,58 mg/dl); 2 - proteinúria (> 1 g/dia); 3 - envolvimento do trato gastrintestinal (sangramento e/ou perfuração e/ou infarto e/ou pancreatite); 4 - envolvimento do SNC; 5 - miocardiopatia. A presença de cada fator corresponde a um ponto e a pontuação varia de zero a cinco (Quadro 4). Em um estudo com 342 pacientes, Guillevin et al. (1996) observaram

taxas de mortalidade de 46%, 26% e 12% nos casos com FFS  $\geq 2$ , FFS=1 e FFS=0, respectivamente, nos primeiros cinco anos após o diagnóstico.

#### Quadro 4

##### *Five-Factors Score (FFS)*

Fatores prognósticos:

1-Proteinúria > 1g/dia.

2-Gastrintestinal (sangramento e/ou perfuração e/ou infarto e/ou pancreatite).

3-Insuficiência renal (creatinina > 1,58 mg/dl).

4-Acometimento do sistema nervoso central.

5-Miocardioapatia.

Guillevin et al. (1996).

### **1.7.COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE**

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) foi descrito por Dausset em 1958; trata-se de um grupo de glicoproteínas polimórficas encontradas em todos os vertebrados e que, em humanos, são chamadas de Antígenos

Leucocitários Humanos (“Human Leukocyte Antigens”, HLA), por terem sido demonstradas inicialmente em leucócitos (Dausset, 1985).

O complexo HLA consiste em um conjunto de aloantígenos, cuja importância foi reconhecida inicialmente no campo dos transplantes de tecidos e órgãos; por este motivo, são também denominados de antígenos de histocompatibilidade, elementos usados pelo sistema imune para diferenciar o próprio do não próprio (Dausset, 1985; Abbas et al., 1994).

Os genes responsáveis pela codificação dos antígenos HLA localizam-se no complexo ou região HLA, que corresponde a um pequeno segmento cromossômico, no braço curto do cromossomo 6 humano (Trowsdale et al., 1985). O complexo contém mais de 220 genes que codificam três classes de moléculas (classes I, II e III), classificadas de acordo com a sua estrutura e função (Robson et al., 2003).

Uma grande característica do CPH é o seu extenso polimorfismo, onde um mesmo gene pode codificar duas ou mais moléculas e cada variante de um gene polimórfico é denominado alelo. Um número cada vez maior desses alelos tem sido observado e o total chega a mais de 1700 (Conde, 2004). A prevalência de alternativas alélicas para a maioria dos locos de CPH classes I e II excede a frequência que ocorreria secundariamente apenas à mutação. Além disso, distintamente das diferenças alélicas de resíduo único que caracterizam outras proteínas, como as imunoglobulinas, o polimorfismo alélico do CPH é caracterizado por diferenças em resíduos múltiplos. Assim, em vez de um produto genético protéico que difere por um a três aminoácidos em apenas um lugar, as moléculas CPH podem diferir por mais de 10% de seus aminoácidos. Tais

diferenças ocorrem em várias áreas das moléculas CPH, mas a maioria das variações ocorre em três áreas específicas, as regiões hipervariáveis 1, 2 e 3. Essas áreas são as responsáveis pela ligação específica dos fragmentos de peptídeo a serem apresentados. Este polimorfismo genético não é acidental. É, isto sim, provavelmente o resultado de seleção positiva para ajudar a sobrevivência contra os múltiplos antígenos aos quais os seres humanos estão expostos (Robinson e Nepom, 1993).

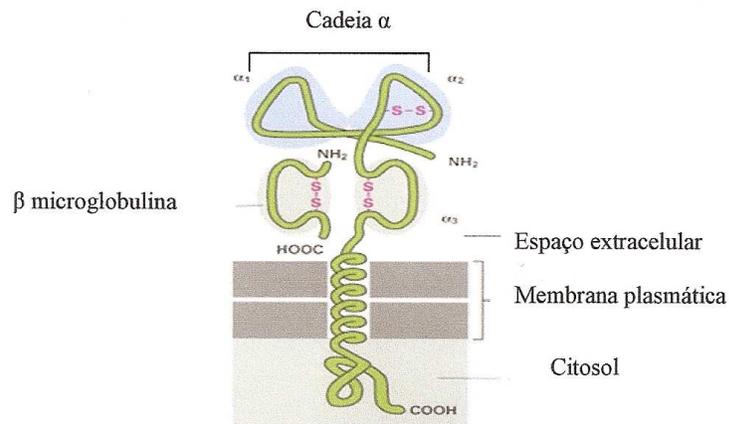
As moléculas de classe I são codificadas por genes localizados na região HLA – A, B e C, enquanto as de classe II, na região HLA – D que é dividida em sub-regiões DR, DQ e DP (Campbell e Trowsdale, 1993). As moléculas de classe I (Figura 3) são constituídas por uma cadeia pesada variável  $\alpha$  (44.000 daltons), transmembrana, codificada pelo CPH, associada não covalentemente à  $\beta$ 2-microglobulina (17.000 daltons), pequena proteína extracelular solúvel, não polimórfica, codificada fora da região do CPH por genes do cromossomo 15 e chamada de cadeia leve invariável (Bjorkman e Parham, 1990; Jones, 1997). A cadeia  $\alpha$  é dividida em três domínios extracelulares ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3). As moléculas de classe I são expressas na superfície de quase todas as células nucleadas do organismo, bem como nas plaquetas; sua principal função é apresentar em sua superfície antígenos endógenos (p.ex.: antígenos tumorais) que são gerados no citoplasma da própria célula, aos linfócitos T CD8+ citotóxicos que, por sua vez, eliminam as células infectadas através da liberação de substâncias tóxicas (Alberts et al., 2002).

As moléculas de classe II (Figura 4) são um heterodímero constituído por duas cadeias glicoprotéicas, uma cadeia  $\alpha$  (34.000 daltons) e uma cadeia  $\beta$  (29.000 daltons), em associação não covalente. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são compostas de 229 e 237 aminoácidos respectivamente e são formadas por três regiões: uma região extracelular hidrofílica, uma transmembrana hidrófoba e uma região intracelular hidrofílica. A região hidrofílica extracelular da cadeia  $\alpha$  contém dois domínios (resíduos 1 a 84 e 85 a 178), designados de  $\alpha$  1 e  $\alpha$  2, respectivamente. A região hidrofílica extracelular da cadeia  $\beta$  também contém dois domínios (resíduos 1 a 91 e 92 a 192) designados de  $\beta$  1 e  $\beta$  2, respectivamente (Brodsky et al., 1996). A expressão das moléculas de classe II ocorre preferencialmente nos linfócitos B, macrófagos, linfócitos T ativados e células endoteliais e sua função é apresentar antígenos exógenos (proteínas que foram endocitadas e degradadas no interior da célula; p.ex.: proteínas bacterianas) aos linfócitos T CD4+, especializados em ativar outras células como macrófagos e outros linfócitos, gerando uma resposta imune ao agente agressor (Strachan, 1987; Abbas et al., 1994; Alberts et al., 2002). Assim, as moléculas de classe II têm um papel central na resposta imune-inflamatória (Zaleski, 1991). Citocinas podem induzir a expressão das moléculas de classe II em uma variedade de células, conferindo-lhes capacidade de apresentação antigênica. As moléculas de classe II são, portanto, produtos de genes envolvidos na resposta imune (Janeway e Travers, 1994).

Os genes relacionados às moléculas de classe III codificam proteínas do sistema complemento (C2, C4) e citocinas tais como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Nepom e Nepom, 1995).

Figura 3

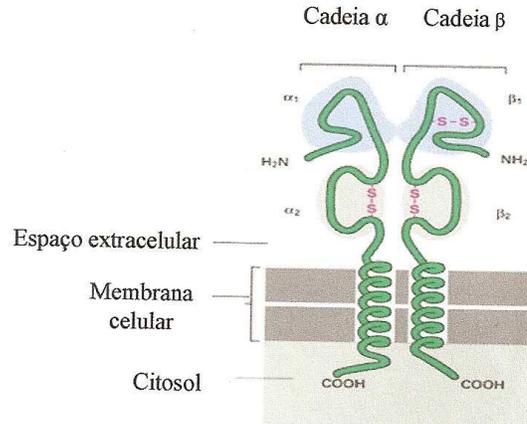
Molécula HLA classe I



Adaptado de Alberts et al. (2002)

Figura 4

Molécula HLA classe II



Adaptado de Alberts et al. (2002)

### 1.8. ALELOS HLA, PAN E POLIANGIÍTE MICROSCÓPICA

Nas vasculites sistêmicas primárias, a existência de predisposição genética associada ao HLA não é consenso na literatura; assim, este é um aspecto ainda

não definido; os dados são escassos, com poucos estudos realizados. A raridade dessas doenças dificulta o estudo do HLA nesses pacientes.

As diferenças encontradas na prevalência de casos de vasculite entre diferentes grupos étnicos (Watts et al., 2001; Tsuchiya et al., 2003) e a ocorrência de casos de PAN e poliangiíte microscópica em membros de uma mesma família (Harris e Jones, 1970; Leff et al., 1971; Reveille et al., 1989; Barbiano Di Belgiojoso et al., 1991; Rotem et al., 1994; Mason et al., 1994) sugerem que fatores ambientais e/ou genéticos podem atuar no desencadeamento dessas doenças. Por outro lado, os alelos HLA também podem atuar como fatores protetores em várias doenças auto-imunes, incluindo-se a PAN e a poliangiíte microscópica (Spencer et al., 1992; Hagen et al., 1995; Boki et al., 1997; Papasteriades et al., 1997; Gencik et al., 1999; Borgmann e Haubitz, 2004; Fietta, 2004).

Com relação à agregação familiar na PAN, Schneider e Goldman (1962) foram os primeiros a relatar a ocorrência de PAN entre irmãos. Harris e Jones (1970) relataram a doença em gêmeas idênticas, com um intervalo de vários anos entre o início dos sintomas em uma e na outra. Leff et al. (1971) relataram o desenvolvimento de PAN em dois irmãos, com evolução fatal em ambos, sendo a mãe portadora de LES. Reveille et al. (1989) observaram a ocorrência de PAN associada à infecção pelo vírus da hepatite B em pai e filho que não compartilhavam nenhum HLA comum. Rottem et al. (1994) descreveram três irmãs com PAN, filhas de um casal saudável e que herdaram o mesmo HLA do pai (DR7;DR53), e mais uma família, com o pai e a filha apresentando granulomatose de Wegener e o filho PAN. Mason et al. (1994) referem o caso de

dois irmãos com PAN e evolução grave que compartilhavam o mesmo HLA (DR5), herdado de mãe saudável; o início da doença nestes irmãos ocorreu com diferença de oito anos (Quadro 5).

Quadro 5  
Agregação familiar na PAN

Referência	Relação	Tipagem HLA-DR
Schneider e Goldman (1962)	Irmãos	NR
Harris e Jones (1970)	Gêmeos	NR
Leff et al. (1971)	Irmãos	NR
Reveille et al. (1989)	Pai e filho	Alelos diferentes
Rottem et al. (1994)	Irmãos	DR7;DR53
Mason et al. (1994)	Irmãos	DR5

NR: Não realizada.

Da mesma forma, na poliangiíte microscópica, também há relatos de agregação familiar da doença. Barbiano Di Belgiojoso et al. (1991) descrevem pai e filho acometidos por poliangiíte microscópica. Heuze-Claudot et al. (1993) e Franssen et al. (1994) observaram casos da doença entre irmãos. Em nenhum desses casos, porém, há referência à investigação dos alelos HLA-DR. Nowack et

al. (1999) relatam a ocorrência de poliangiíte microscópica em irmãos que apresentavam HLA-DR2 herdado dos pais (Quadro 6).

Quadro 6

Agregação familiar na poliangiíte microscópica.

Referência	Relação	Tipagem HLA-DR
Barbiano et al. (1991)	Pai/filho	NR
Claudot et al. (1993)	Irmãos	NR
Franssen et al. (1994)	Irmãos	NR
Nowack et al. (1999)	Irmãos	DR2

NR: Não realizada.

Os estudos de casos familiares nas vasculites sistêmicas primárias são importantes para avaliar a possibilidade de uma possível predisposição genética para estas doenças e também o papel de fatores ambientais, tais como a exposição comum dos membros de uma mesma família aos mesmos determinantes antigênicos que podem vir a representar o papel de gatilho nestas condições. Nowack et al. (1999) sugerem que nas vasculites sistêmicas primárias parece importante o papel de uma combinação de fatores genéticos, talvez ligados ao HLA, associados a um provável fator desencadeante ambiental.

Com relação a estudos mais detalhados, idealizados com o objetivo de investigar uma possível associação entre os alelos HLA-DR e o diagnóstico da

PAN/poliangiíte microscópica, avaliando um número maior de casos em comparação com controles saudáveis da mesma população, os dados ainda são muito escassos, tanto na PAN quanto na poliangiíte microscópica (Quadros 7 e 8).

Elkon et al. (1983) avaliaram 15 pacientes caucasóides com PAN não associada ao vírus da hepatite B e não observaram diferença estatisticamente significativa quanto à frequência de determinado alelo HLA-DR em comparação com controles saudáveis. Os autores estudaram também a frequência dos alelos HLA-DR em 17 pacientes com granulomatose de Wegener e encontraram uma maior frequência do HLA-DR2 nos casos em comparação aos controles saudáveis. Os autores sugerem que a demonstração de uma maior frequência do HLA-DR2 nos casos de granulomatose de Wegener, mas não nos casos de PAN, é uma evidência de que estas doenças são entidades distintas, com diferentes mecanismos etiopatogênicos.

Reveille et al. (1989) estudaram 18 pacientes com PAN (14 caucasóides e quatro afro-americanos; sendo três deles de PAN associada ao vírus da hepatite B) e não observaram nenhuma associação com determinado alelo HLA-DR.

Boki et al. (1997) investigaram os alelos HLA-DR em 22 pacientes com PAN ou poliangiíte microscópica (sete com PAN, nove com poliangiíte microscópica e seis nos quais não foi possível diferenciar o diagnóstico e classificar com exatidão). Os autores encontraram ausência do DR3 nos casos - não diferenciaram a PAN da poliangiíte microscópica na análise - em contraste com a presença em 17% na população grega, e sugerem um possível efeito protetor deste HLA relacionado ao desenvolvimento das doenças.

## Quadro 7

Associação entre os alelos HLA-DR e o diagnóstico de PAN.

Referência	Ano	País	n	Associação
Elkon et al.	1983	Inglaterra	15	Nenhuma
Reveille et al.	1989	EUA	18	Nenhuma

EUA: Estados Unidos da América.

Spencer et al. (1992) avaliaram os alelos HLA-DR em 59 pacientes caucasóides com AASV (34 com granulomatose de Wegener e 25 com poliangiíte microscópica) comparados com controles saudáveis e encontraram uma menor frequência do HLA-DR3 nos casos; não fizeram análises separadas de acordo com o diagnóstico. Os autores sugerem que o DR3 pode ser um fator protetor contra as AASV, associando-se a uma não-responsividade dominante a uma variedade de antígenos exógenos, explicando-se este fato através da eliminação HLA-dependente de células T auto-reativas no timo durante a ontogênese e/ou indução alelo-específica de células T supressoras periféricas.

Thomson et al. (1994) estudaram 27 pacientes portadores de AASV, 23 com granulomatose de Wegener ou poliangiíte microscópica, e mais quatro com outros diagnósticos. Os autores encontraram uma associação positiva com a presença do HLA-DR8 que se apresentou mais frequente nos casos em comparação com o grupo controle; não fizeram análises separadas de acordo com o diagnóstico. Os

autores sugerem uma relação entre as AASV e o CMH através da apresentação preferencial de determinados peptídeos antigênicos via HLA-DR para células T específicas.

Hagen et al. (1995) avaliaram os alelos HLA-DR em 224 pacientes caucasóides com AASV (25 com poliangiíte microscópica), 95% dos quais apresentavam positividade para o ANCA, comparados com controles saudáveis doadores de sangue. Os autores observaram uma menor frequência estatisticamente significativa do DR6/DR13 no grupo total de casos e sugerem um efeito protetor deste HLA contra as AASV, através de uma provável modulação da resposta imune-inflamatória de células T auto-reativas; entretanto, quando os pacientes com poliangiíte microscópica foram analisados separadamente, não observaram nenhuma associação estatisticamente significativa entre o diagnóstico da doença e quaisquer dos alelos HLA-DR.

Zhang et al. (1995) estudaram um grupo de 94 pacientes com AASV (56 com granulomatose de Wegener, 31 com poliangiíte microscópica e sete com vasculite limitada aos rins) em comparação com 90 indivíduos saudáveis da mesma população e não encontraram diferenças na distribuição dos alelos HLA-DR; apenas o grupo total de casos foi analisado; não fizeram análises separadas de acordo com o diagnóstico.

Papasteriades et al. (1997) investigaram os alelos HLA-DR em 23 pacientes caucasóides com poliangiíte microscópica com nefropatia. Os autores observaram uma menor frequência do HLA-DR3 nos pacientes quando comparados aos controles saudáveis. Os autores sugerem que fatores genéticos têm um importante papel em determinar susceptibilidade ou influenciar a expressão da

doença e que a menor frequência do HLA-DR3 nos casos pode indicar uma atuação deste HLA como fator de proteção para a doença, provavelmente através de uma possível participação na regulação da resposta imune ao antígeno exógeno, determinando se uma partícula deve ou não ser apresentada.

Gencik et al. (1999) observaram uma menor frequência do HLA-DRB1\*13 em 102 pacientes com AASV, 26 com anticorpos anti-MPO e 76 com anti-PR3, em comparação com controles saudáveis doadores de sangue da mesma população; não fizeram análises separadas de acordo com o diagnóstico. Os autores sugerem um possível efeito protetor do DRB1\*13 contra o desenvolvimento de AASV através da modulação da resposta de células T.

Tsuchiya et al. (2003) observaram uma maior frequência do alelo HLA-DRB1\*0901 na avaliação de 50 pacientes asiáticos com poliangiíte microscópica quando comparados com controles saudáveis. Os autores sugerem que o HLA-DRB1\*0901 pode estar relacionado à produção de anticorpos anti-MPO na população asiática, sendo que o mecanismo desta provável associação ainda é pouco conhecido.

Stassen et al. (2003) estudaram 241 pacientes com AASV, 183 com anticorpos anti-PR3 e 58 com anti-MPO; não fizeram análises separadas de acordo com o diagnóstico. Os pacientes apresentaram uma maior frequência do HLA-DR4 e uma menor frequência do HLA-DR6 em comparação com doadores de sangue da mesma população. Os mesmos autores ampliaram a casuística para 304 pacientes com AASV, sendo a maioria (241) portadora de granulomatose de Wegener, e observaram, mais uma vez, uma maior frequência de DR4 e uma menor frequência de DR13 (6) em comparação com doadores de

sangue da mesma população (Stassen et al., 2009); entretanto, quando consideraram apenas os casos com diagnóstico de poliangiíte microscópica (30 pacientes), não observaram nenhuma associação com quaisquer alelos HLA-DR.

#### Quadro 8

Associação entre os alelos HLA-DR e o diagnóstico de poliangiíte microscópica

Referência	Ano	País	n	Associação
Hagen et al.	1995	Holanda	25	Nenhuma
Papasteriades et al.	1997	Grécia	23	↓ DR3
Tsuchiya et al.	2003	Japão	50	↑ DRB1*0901
Stassen et al.	2009	Holanda	30	Nenhuma

Frequência: ↓: menor; ↑: maior.

Não há estudos a respeito da associação entre os alelos HLA-DR, manifestações clínicas e gravidade de doença em grupos de pacientes com PAN ou poliangiíte microscópica.

Papasteriades et al. (1997) descrevem cinco de seis pacientes com poliangiíte microscópica e doença renal rapidamente progressiva não responsiva ao tratamento, positivos para HLA-DR5 e sugerem que este HLA pode estar relacionado a uma doença mais grave.

Assim, considerando-se a possibilidade da participação de alelos HLA na PAN e/ou na poliangiíte microscópica, seja como fator de risco ou de proteção, o

presente estudo propõe-se a avaliar esta associação em uma população brasileira caucasóide com PAN/poliangiíte microscópica.

Acreditamos que a realização deste estudo é importante, pois, desde os primeiros relatos até os dias atuais, houve significativas mudanças: a definição de melhores critérios classificatórios, com uma mais adequada distinção entre a PAN e a poliangiíte microscópica, que permite uma seleção mais adequada dos doentes a serem investigados; a diferenciação dos casos de PAN em associados ou não ao vírus da hepatite B; a idealização de instrumentos mais adequados para avaliar a atividade e a gravidade de doença (BVAS e FFS) e mudanças na metodologia de investigação dos alelos HLA, com o surgimento de novas técnicas que permitem identificar mais adequadamente os polimorfismos moleculares. Outro aspecto que justifica a importância deste estudo é a ausência de relatos na nossa população.

## **2.OBJETIVOS**

1 - Avaliar a frequência dos alelos HLA-DR em um grupo de pacientes com PAN/poliangiíte microscópica.

2 – Investigar uma possível relação entre os alelos HLA-DR, os índices de atividade e gravidade de doença e as manifestações clínicas do grupo de pacientes com PAN/poliangiíte microscópica.

### **3.CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1.SELEÇÃO DOS PACIENTES**

Foram coletados os dados dos prontuários dos pacientes com diagnóstico de PAN ou poliangiíte microscópica do ambulatório de vasculites do Hospital das Clínicas/Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/FCM-UNICAMP) entre os anos de 1985 e 2003 e dos pacientes com diagnóstico de PAN do ambulatório de vasculites do Hospital das Clínicas/Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FM-USP).

O diagnóstico de cada paciente foi revisado de acordo com os critérios do ACR para a PAN (Lightfoot Jr. et al., 1990) e da Conferência Internacional de Consenso de Chapel Hill (CHCC) para poliangiíte microscópica (Jennette et al., 1994).

O diagnóstico de PAN foi considerado quando não havia evidências de envolvimento de pequenos vasos (arteríolas, vênulas e/ou capilares) tais como lesões cutâneas purpúreas, glomerulonefrite necrosante pauci-imune e/ou capilarite pulmonar. O diagnóstico de poliangiíte microscópica foi orientado pela presença de manifestações sugestivas do envolvimento de pequenos vasos, sendo desconsiderados os casos que apresentavam granuloma e/ou eosinófilos nos achados histopatológicos.

Foram selecionados os pacientes com fenótipo caucasóide com diagnóstico de PAN não associada ao vírus da hepatite B ou poliangiíte microscópica. Foram excluídos os pacientes com outras doenças auto-imunes associadas e/ou com sorologia positiva para hepatite B e/ou C e/ou HIV.

Uma ficha padrão foi preenchida com os dados clínicos, laboratoriais, arteriográficos e histopatológicos por ocasião do diagnóstico (Anexo 2). O

protocolo de avaliação clínica incluiu dados de identificação, história da doença, exame físico e a realização dos seguintes exames laboratoriais: hemograma com plaquetas, determinação da VHS (Wintrobe), urina I, proteinúria de 24 horas quando necessário, dosagem de uréia, creatinina, aminotransferases, pesquisa de FAN (imunofluorescência indireta), ANCA (imunofluorescência indireta), crioglobulinas e sorologias para hepatites B e C e HIV. Os achados angiográficos das artérias mesentéricas/renais e os dados histopatológicos também foram coletados, quando disponíveis.

A atividade e a gravidade da doença foram avaliadas retrospectivamente, por ocasião do diagnóstico, utilizando-se, respectivamente, o *Birmingham Vasculitis Activity Score* (BVAS) (Luqmani et al., 1994) (Anexo 1) e o *Five- Factors Score* (FFS) (Guillevin et al., 1996). De acordo com o BVAS, os pacientes foram divididos em dois grupos: aqueles com BVAS < 22 e outro com BVAS ≥ 22 (Guillevin et al., 1999). De acordo com o FFS, duas classes de *score* foram definidas: 0, quando nenhum fator de pior prognóstico foi notado e ≥ 1 quando 1 ou mais fatores estavam presentes (Guillevin et al., 1999).

As manifestações clínicas presentes por ocasião do diagnóstico foram avaliadas de acordo com o sistema orgânico acometido, separadas em: gerais, articulares, musculares, neurológicas centrais, neurológicas periféricas, cutâneas, pulmonares, gastrintestinais, cardiovasculares, renais e oculares.

Os pacientes foram divididos em três grupos: 1 - Total, que englobou os casos de PAN e de poliangiíte microscópica; 2 – PAN não relacionada ao vírus da hepatite B e 3 – Poliangiíte microscópica.

As amostras de sangue para determinação dos alelos HLA-DR foram obtidas durante a avaliação clínica rotineiramente realizada nos ambulatórios, após consentimento informado (Anexo 3). A pesquisa foi iniciada após aprovação pela Comissão de Ética da FCM-UNICAMP (Anexo 4). Foram utilizadas as recomendações do *European league against rheumatism* (EULAR) para a realização de estudos clínicos em pacientes com vasculites sistêmicas primárias (Hellmich et al., 2007).

### **3.2.GRUPO CONTROLE**

Indivíduos com fenótipo caucasóide, saudáveis, sem história e/ou clínica de doença auto-imune em número de duas vezes o número de casos. As amostras

foram coletadas durante doação de sangue no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da FCM/UNICAMP, após consentimento informado (Anexo 3).

### **3.3.MÉTODOS**

#### **3.3.1.EXTRAÇÃO DE DNA**

##### **3.3.1.1.Obtenção dos leucócitos**

A partir de 5 ml de sangue periférico, colhido em frasco de vacutainer, com EDTA 15% como anticoagulante, foi realizada a lise das hemácias para a obtenção dos leucócitos das amostras da casuística. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1.800 rpm, por 10 minutos; depois, o plasma foi descartado e as hemácias lisadas com uma mistura de uma solução 1:10 de cloreto de amônio e bicarbonato de amônio, por 20 minutos em repouso à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as amostras foram centrifugadas a 3600 rpm, por 15 minutos, sendo depois descartado o sobrenadante; o processo de lise foi repetido até que se obteve um “pellet” de leucócitos livre de hemácias.

#### 3.3.1.2. Lise dos leucócitos e precipitação do DNA

Ao “pellet” de leucócitos foi adicionado 1 ml de DNAzol™ (Gibco BRL, Invitrogen). As amostras contendo o DNAzol™ foram mantidas por três horas em repouso à temperatura ambiente, acrescentando-se em seguida 1 ml de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA que foi retirado com a ajuda de uma pipeta Pasteur e colocado em um eppendorf contendo 300  $\mu$ l de etanol 70% gelado; as amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Para a diluição do DNA utilizou-se de 150 a 300  $\mu$ l de água destilada estéril, de acordo com o “pellet” de DNA obtido. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C “overnight” para a sua solubilização. A quantificação do DNA foi realizada pelo High DNA Mass™ Ladder (Gibco BRL, Invitrogen), um marcador de massa molecular baseado na comparação da intensidade da banda da amostra de DNA teste com a intensidade das bandas do

marcador. As amostras foram então estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior genotipagem.

### **3.3.2. TIPAGEM DOS ALELOS HLA-DR PELA TÉCNICA PCR-SSP DE BAIXA RESOLUÇÃO**

A tipagem dos alelos HLA-DR foi realizada através da técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se sequências específicas de *primers* DR de baixa resolução (Dynal, Biotech Ltd. UK).

A PCR é um método de biologia molecular que permite a amplificação de um fragmento específico de DNA escolhido pelo investigador, cuja concentração final excede em milhares de vezes à do restante do DNA presente na amostra analisada. A reação consiste basicamente de três fases: primeira: desnaturação da fita molde de DNA, ou seja, a sua separação; segunda: anelamento dos *primers* na fita molde e terceira: síntese da nova sequência do DNA.

Para cada amostra de DNA dos pacientes e controles, foram realizados os seguintes procedimentos: Em tubos especiais para PCR devidamente identificados, foram distribuídos  $5\ \mu\text{l}$  das soluções de *primers* num total de 24 *primers* para cada tipagem HLA-DR. Em um outro tubo, foi preparada uma solução contendo  $84\ \mu\text{l}$  de solução stock de PCR ( $131\ \mu\text{l}$  de tampão PCR 10x que já vem pronto no Kit TAQ DNA Polymerase nativa,  $56\ \mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}$ ,  $93,2\ \mu\text{l}$  de glicerol 99,9%,  $3,8\ \mu\text{l}$  de cada base de nucleotídeos dCTP, dGTP, dATP, dTTP na concentração de 10 mM,  $265\ \mu\text{l}$  de água deionizada estéril),  $54\ \mu\text{l}$  de DNA ( $\sim 50\text{ng}/\mu\text{l}$ ) e  $2,2\ \mu\text{l}$  de Taq Polymerase (=11 unidades), essa solução foi

vortexeada gentilmente e em seguida 5  $\mu$ l da mesma foi distribuída em cada um dos 24 tubos contendo os *primers*. Em seguida, a amplificação foi realizada em um termociclador. No total, 30 ciclos foram utilizados com desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, os 10 primeiros ciclos com desnaturação a 94°C, por 10 segundos, anelamento e extensão a 65°C, por 60 segundos e após, 20 ciclos com desnaturação a 94°C, por 10 segundos, anelamento a 61°C, por 50 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos. Os produtos da reação de amplificação foram aplicados em uma cuba de eletroforese horizontal contendo gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Após 30 minutos de corrida, os produtos da PCR foram visualizados sob iluminação ultravioleta e o gel fotografado utilizando-se o sistema Polaroid para documentação e posterior análise dos resultados.

A interpretação dos resultados foi realizada através de uma tabela fornecida pelo kit Dynal SSP HLA-DR de baixa resolução, constatando-se assim a presença ou ausência de alelos ou grupos de alelos HLA-DR, segundo os seus padrões de amplificação específicos previamente definidos.

A tipagem HLA-DR foi realizada de acordo com a *Nomenclature for factors of the HLA system, 2002* (Marsh et al., 2002) e os seguintes alelos foram estudados: B1\*01, B1\*03, B1\*04, B1\*07, B1\*08, B1\*10, B1\*11, B1\*12, B1\*13, B1\*14, B1\*15, B1\*16, B3, B4\*01 e B5. Os alelos B1\*11 e B1\*12, B1\*13 e B1\*14 e B1\*15 e B1\*16 foram estudados isoladamente e também em conjunto para possibilitar a comparação de nossos resultados com os dos estudos prévios que utilizaram uma nomenclatura HLA-DR mais antiga (Quadro 9).

#### Quadro 9

### Nomenclatura dos alelos HLA-DR.

Alelos HLA-DR	Equivalente prévio
DRB1*01	DR1
DRB1*03	DR3
DRB1*04	DR4
DRB1*07	DR7
DRB1*08	DR8
DRB1*09	DR9
DRB1*10	DR10
DRB1*11	DR5
DRB1*12	DR5
DRB1*13	DR6
DRB1*14	DR6
DRB1*15	DR2
DRB1*16	DR2
DRB3	DR52
DRB4*01	DR53
DRB5	DR51

Marsh et al. (2002)

### 3.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística foi avaliada pelo teste do  $\chi^2$  ou teste exato de Fisher.

Valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## **4.RESULTADOS**

### **4.1.ACHADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS**

Foram identificados 29 pacientes que puderam ser convocados para coleta de sangue, sendo que 19 preencheram os critérios classificatórios para PAN, 14 da FCM/UNICAMP e cinco da FM-USP, e 10 para poliangiíte microscópica. Dentre os pacientes com PAN, oito eram do sexo masculino e 11 do feminino, com idades por ocasião do diagnóstico variando de 12 a 52 anos, com média de  $36,7 \pm 11,5$  anos. Dentre os pacientes com poliangiíte microscópica, três eram do sexo masculino e sete do feminino, com idades por ocasião do diagnóstico variando de 24 a 70 anos, com média de  $39,2 \pm 15$  anos. Dos 59 controles, 30 eram do sexo masculino e 29 do feminino, com idades variando de 19 a 59 anos, com média de  $36,6 \pm 10,7$  anos (Tabela 1).

Tabela 1

Características demográficas dos casos e controles.

Característica	PAN (n=19)	Poliangiíte (n=10)	Controles (n=59)
Média de idade (anos)	$36,7 \pm 11,5$	$39,2 \pm 15$	$36,6 \pm 10,7$
Gênero M/F	8/11	3/7	30/29

M: masculino; F: feminino.

As manifestações clínicas, o BVAS e o FFS dos pacientes estudados, por ocasião do diagnóstico, estão na Tabela 2.

Nos pacientes com PAN, mialgia difusa, presente em 79% dos casos, e sintomas gerais como febre e/ou emagrecimento, e lesões cutâneas, em 74%,

foram as manifestações clínicas mais frequentemente encontradas. As lesões cutâneas mais frequentemente observadas foram nódulos e livedo reticular. Artralgia e/ou artrite foram encontradas em 53% dos pacientes. NP esteve presente em 53% dos casos, expressando-se mais frequentemente como mononeurite múltipla. Acometimento do SNC foi observado em 31% dos casos, a maioria com acidente vascular cerebral. Envolvimento renal manifestado por elevação da pressão arterial, hematúria e/ou proteinúria esteve presente em 53% dos casos; um destes casos com insuficiência renal. Acometimento do trato gastrointestinal foi observado em 31% dos casos, a maioria com dores abdominais; dentre estes, verificou-se enterorragia em um caso. Dez pacientes (53%) apresentavam BVAS < 22 e nove (47%) BVAS ≥ 22. Em relação ao FFS, dez pacientes (53%) apresentavam FFS=0 e nove (47%) FFS ≥ 1.

Nos pacientes com poliangiíte microscópica, artralgia e/ou artrite (90%) e lesões cutâneas (80%), na maioria lesões purpúreas, foram as manifestações clínicas mais frequentemente observadas. Sintomas gerais como febre e emagrecimento estavam presentes em metade dos casos. NP foi encontrada em 60% dos casos. Envolvimento do trato gastrointestinal foi observado em 60% dos casos, dentre estes, um paciente com enterorragia e perfuração. Acometimento renal evidenciado por elevação da pressão arterial, hematúria e/ou proteinúria esteve presente em 40% dos casos; em três destes pacientes observou-se insuficiência renal. Acometimento pulmonar foi evidenciado em três pacientes (30%), dois deles com hemorragia alveolar. Sete pacientes (70%) apresentavam

BVAS < 22 e três (30%) BVAS ≥ 22. Em relação ao FFS, quatro pacientes apresentavam FFS=0 (40%) e seis FFS ≥ 1 (60%).

Tabela 2

Manifestações clínicas, BVAS e FFS dos casos (%).

Manifestação clínica	Total (n=29)	PAN (n=19)	Poliangiíte (n=10)
Sintomas gerais	19 (65)	14 (74)	5 (50)
Articular	19 (65)	10 (53)	9 (90)
Muscular	19 (65)	15 (79)	4 (40)
SNC	6 (21)	6 (31)	0 (00)
NP	16 (55)	10 (53)	6 (60)
Cutânea	22 (76)	14 (74)	8 (80)
Pulmonar	4 (14)	1 (5)	3 (30)
Gaстрintestinal	12 (41)	6 (31)	6 (60)
Cardiovascular	3 (10)	1 (5)	2 (20)
Renal	14 (48)	10 (53)	4 (40)
Ocular	5 (17)	2 (10)	3 (30)
BVAS < 22	17 (59)	10 (53)	7 (70)
BVAS ≥ 22	12 (41)	9 (47)	3 (30)
FFS = 0	14 (48)	10 (53)	4 (40)
FFS ≥ 1	15 (52)	9 (47)	6 (60)

SNC: sistema nervoso central; NP: neuropatia periférica.

O ANCA foi pesquisado em 15 dos 19 pacientes com PAN e apresentou-se negativo em todos; e em oito dos dez pacientes com poliangiíte microscópica, três apresentaram p-ANCA e um c-ANCA positivo.

## 4.2.ALELOS HLA-DR

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos alelos HLA-DR nos grupos de casos quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3

Alelos HLA-DR nos casos e controles (%).

HLA-DR	Total (n=29) n (%)	PAN (n=19) n (%)	Poliangiíte (n=10) n (%)	Controles (n=59) n (%)
B1*01	7 (24)	5 (26)	2 (20)	12 (20)
B1*03	6 (21)	4 (21)	2 (20)	11 (19)
B1*04	6 (21)	5 (26)	1 (10)	20 (34)
B1*07	5 (17)	5 (26)	0 (00)	10 (17)
B1*08	2 (7)	2 (10)	0 (00)	6 (10)
B1*09	0 (00)	0 (00)	0 (00)	2 (3)
B1*10	1 (3)	1 (5)	0 (00)	1 (2)
B1*11	9 (31)	5 (26)	4 (40)	16 (27)
B1*12	1 (3)	0 (00)	1 (10)	2 (3)
B1*13	4 (14)	1 (5)	3 (30)	11 (19)
B1*14	4 (14)	2 (10)	2 (20)	9 (15)
B1*15	5 (17)	2 (10)	3 (30)	6 (10)
B1*16	3 (10)	2 (10)	1 (10)	2 (3)
B3	18 (62)	10 (53)	8 (80)	43 (73)
B4*01	10 (34)	9 (47)	1 (10)	28 (47)
B5	7 (24)	4 (21)	3 (30)	8 (14)
B1*11/B1*12	10 (34)	5 (26)	5 (50)	18 (30)
B1*13/B1*14	6 (21)	2 (10)	4 (40)	19 (32)
B1*15/B1*16	7 (24)	4 (21)	3 (30)	8 (14)

Com relação ao grupo total de casos, encontrou-se uma maior frequência estatisticamente significativa de HLA-DRB1\*16 ( $p=0.023$ ) e DRB4\*01 ( $p=0.048$ ) no grupo de pacientes com um maior índice de atividade de doença por ocasião do diagnóstico ( $BVAS \geq 22$ ) quando comparado aos grupos com  $BVAS < 22$  e controle (Tabela 4).

Tabela 4

Alelos HLA-DR no grupo total de casos de acordo com o BVAS e nos controles

HLA-DR	BVAS $\geq 22$ (n=12)	BVAS $< 22$ (n=17)	Controles (n=59)
	n (%)	n (%)	n (%)
B1*01	5 (42)	2 (12)	12 (20)
B1*03	1 (8)	5 (29)	11 (19)
B1*04	4 (33)	2 (12)	20 (34)
B1*07	3 (25)	2 (12)	10 (17)
B1*08	0 (00)	2 (12)	6 (10)
B1*09	0 (00)	0 (00)	2 (3)
B1*10	0 (00)	1 (6)	1 (2)
B1*11	3 (25)	6 (35)	16 (27)
B1*12	0 (00)	1 (6)	2 (3)
B1*13	0 (00)	4 (24)	11 (19)
B1*14	1 (8)	3 (18)	9 (15)
B1*15	3 (25)	2 (12)	6 (10)
B1*16	<b>3 (25)*</b>	<b>0 (00)*</b>	<b>2 (3)*</b>
B3	5 (42)	13 (76)	43 (73)
B4*01	<b>7 (58)*</b>	<b>3 (18)*</b>	<b>28 (47)*</b>
B5	5 (42)	2 (12)	8 (14)
B1*11/B1*12	3 (25)	7 (41)	18 (30)
B1*13/B1*14	1 (8)	5 (29)	19 (32)
B1*15/B1*16	5 (42)	2 (12)	8 (14)

\* $p < 0,05$

Os pacientes sem fatores de pior prognóstico (FFS=0) apresentaram uma maior frequência estatisticamente significativa de HLA-DRB1\*03 em comparação aos casos com FFS  $\geq 1$  e ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5

Alelos HLA-DR no grupo total de casos de acordo com o FFS e nos controles.

HLA-DR	FFS $\geq 1$ (n=15)	FFS = 0 (n=14)	Controles (n=59)
	n (%)	n (%)	n (%)
B1*01	5 (33)	2 (14)	12 (20)
B1*03	<b>0 (00)*</b>	<b>6 (43)*</b>	<b>11 (19)*</b>
B1*04	2 (13)	4 (29)	20 (34)
B1*07	4 (27)	1 (7)	10 (17)
B1*08	1 (7)	1 (7)	6 (10)
B1*09	0 (00)	0 (00)	2 (3)
B1*10	0 (00)	1 (7)	1 (2)
B1*11	5 (33)	4 (29)	16 (27)
B1*12	0 (00)	1 (7)	2 (3)
B1*13	3 (20)	1 (7)	11 (19)
B1*14	2 (13)	2 (14)	9 (15)
B1*15	4 (27)	1 (7)	6 (10)
B1*16	2 (13)	1 (7)	2 (3)
B3	8 (53)	10 (71)	43 (73)
B4*01	6 (40)	4 (29)	28 (47)
B5	5 (33)	2 (14)	8 (14)
B1*11/B1*12	5 (33)	5 (35)	18 (30)
B1*13/B1*14	4 (27)	2 (14)	19 (32)
B1*15/B1*16	5 (33)	2 (14)	8 (14)

\*p < 0,05

A frequência de HLA-DRB1\*11 e/ou B1\*12 ( $p=0.046$ ), B1\*13 ( $p=0.021$ ) e B3 ( $p=0.008$ ) foi significativamente maior nos pacientes com envolvimento gastrintestinal e a de DRB1\*15 e/ou DRB1\*16 ( $p=0.035$ ) e B5 ( $p=0.035$ ) nos pacientes com acometimento renal, quando comparados aos pacientes sem envolvimento gastrintestinal e renal, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6

Alelos HLA-DR e manifestações clínicas gastrintestinais/renais (ausentes/presentes) no grupo total de casos (n=29).

HLA-DR	Gastrintestinal (%)	Renal (%)
B1*01	23/25	20/29
B1*03	23/17	27/14
B1*04	29/8	7/36
B1*07	23/8	20/14
B1*08	12/0	13/0
B1*09	0/0	0/0
B1*10	6/0	7/0
B1*11	<b>12/58*</b>	40/21
B1*12	6/0	7/0
B1*13	<b>0/33*</b>	20/7
B1*14	12/17	20/7
B1*15	18/17	7/29
B1*16	18/0	0/21
B3	<b>41/92*</b>	73/50
B4*01	47/17	20/50
B5	29/17	<b>7/43*</b>
B1*11/B1*12	<b>18/58*</b>	47/21
B1*13/B1*14	12/33	27/14
B1*15/B1*16	29/17	<b>7/43*</b>

\* $p < 0,05$

Com relação aos pacientes com PAN, não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências dos alelos HLA-DR considerando-se o BVAS e o FFS em comparação com os controles e a presença ou ausência de manifestações clínicas específicas.

Com relação aos pacientes com poliangiíte microscópica, aqueles com BVAS  $\geq 22$  ( $p=0.038$ ) e FFS  $\geq 1$  ( $p=0.039$ ) apresentaram uma maior frequência estatisticamente significativa de DRB1\*15 quando comparados aqueles com BVAS  $< 22$  e FFS = 0 e aos controles. Encontrou-se também uma maior frequência estatisticamente significativa de DRB1\*15 e/ou DRB1\*16 ( $p=0.033$ ) e B5 ( $p=0.033$ ) nos pacientes com envolvimento renal e de DRB1\*11 e/ou DRB1\*12 ( $p=0.023$ ) nos pacientes ANCA negativos, quando comparados aqueles sem envolvimento renal e ANCA positivos, respectivamente (Tabelas 7, 8, 9 e 10).

Dois outros pacientes com PAN associada ao vírus da hepatite B foram estudados. Encontrou-se a presença dos seguintes alelos DR: B1\*11, B1\*16, B3 e B5 no primeiro e B1\*07, B1\*15, B4\*01 e B5 no segundo.

DRB1\*09 mostrou-se ausente em todos os casos e presente em apenas dois controles.

Tabela 7

Alelos HLA-DR no grupo de casos com poliangiíte microscópica de acordo com o BVAS e no grupo controle.

HLA-DR	BVAS $\geq$ 22 (n=3) n (%)	BVAS <22 (n=7) n (%)	Controles (n=59) n (%)
B1*01	1 (33)	1 (14)	12 (20)
B1*03	0 (00)	2 (29)	11 (19)
B1*04	1 (33)	0 (00)	20 (34)
B1*07	0 (00)	0 (00)	10 (17)
B1*08	0 (00)	0 (00)	6 (10)
B1*09	0 (00)	0 (00)	2 (3)
B1*10	0 (00)	0 (00)	1 (2)
B1*11	0 (00)	4 (57)	16 (27)
B1*12	0 (00)	1 (14)	2 (3)
B1*13	0 (00)	3 (43)	11 (19)
B1*14	1 (33)	1 (14)	9 (15)
B1*15	<b>2 (67)*</b>	<b>1 (14)*</b>	<b>6 (10)*</b>
B1*16	1 (33)	0 (00)	2 (3)
B3	1 (33)	7 (100)	43 (73)
B4*01	1 (33)	0 (00)	28 (47)
B5	2 (67)	1 (14)	7 (12)
B1*11/B1*12	0 (00)	5 (71)	18 (30)
B1*13/B1*14	1 (33)	3 (43)	19 (32)
B1*15/B1*16	2 (67)	1 (14)	8 (14)

\*p < 0,05

Tabela 8

Alelos HLA-DR no grupo de casos com poliangiíte microscópica  
de acordo com o FFS e no grupo controle.

HLA-DR	FFS ≥1 (n=6) n (%)	FFS =0 (n=4) N (%)	Controles (n=59) n (%)
B1*01	1 (17)	1 (25)	12 (20)
B1*03	0 (00)	2 (50)	11 (19)
B1*04	1 (17)	0 (00)	20 (34)
B1*07	0 (00)	0 (00)	10 (17)
B1*08	0 (00)	0 (00)	6 (10)
B1*09	0 (00)	0 (00)	2 (3)
B1*10	0 (00)	0 (00)	1 (2)
B1*11	2 (33)	2 (50)	16 (27)
B1*12	0 (00)	1 (25)	2 (3)
B1*13	2 (33)	1 (25)	11 (19)
B1*14	1 (17)	1 (25)	9 (15)
B1*15	<b>3 (50)*</b>	<b>0 (00)*</b>	<b>6 (10)*</b>
B1*16	1 (17)	0 (00)	2 (3)
B3	4 (67)	4 (100)	43 (73)
B4*01	1 (17)	0 (00)	28 (47)
B5	3 (50)	0 (00)	8 (14)
B1*11/B1*12	2 (33)	3 (75)	18 (30)
B1*13/B1*14	3 (50)	1 (25)	19 (32)
B1*15/B1*16	3 (50)	0 (00)	8 (14)

\*p < 0,05

Tabela 9

Alelos HLA-DR no grupo de pacientes com poliangiíte microscópica e acometimento renal (ausente/presente) (n=10).

HLA-DR	Renal (%)
B1*01	17/25
B1*03	33/0
B1*04	0/25
B1*07	0/0
B1*08	0/0
B1*09	0/0
B1*10	0/0
B1*11	67/0
B1*12	17/0
B1*13	33/25
B1*14	17/25
B1*15	<b>0/75*</b>
B1*16	0/25
B3	100/50
B4*01	0/25
B5	<b>0/75*</b>
B1*11/B1*12	83/0
B1*13/B1*14	33/50
B1*15/B1*16	<b>0/75*</b>

\*p < 0,05

Tabela 10

Alelos HLA-DR nos pacientes com poliangiíte microscópica de acordo com o ANCA (presença/ausência) (n=8).

HLA-DR	ANCA positivo (n=4) (%)	ANCA negativo (n=4) (%)
DRB1*11/DRB1*12	1 (25)	<b>4 (100)*</b>

\*p < 0,05

Os resultados de todas as outras comparações realizadas, não apresentados nesta seção, estão tabelados no Anexo 5.

## **5.DISCUSSÃO**

A PAN e a poliangiíte microscópica são vasculites sistêmicas primárias raras, cujos mecanismos etiopatogênicos ainda não são totalmente esclarecidos, envolvendo a produção de ANCA na poliangiíte microscópica e de imunocomplexos na PAN (Lightfoot Jr. et al., 1990; Jennette et al., 1994; Borgmann e Haubitz, 2004; Hellmich et al., 2007).

Até o presente momento, não se sabe se polimorfismos envolvendo genes responsáveis pela produção de moléculas envolvidas na resposta imune-inflamatória podem causar susceptibilidade para o desencadeamento da PAN/poliangiíte microscópica. Alguns polimorfismos têm sido estudados e hipóteses têm sido formuladas a respeito de uma possível influência fisiopatológica (Nowack et al., 1999; Fietta, 2004).

Nas AASV, polimorfismos relacionados ao controle da expressão constitutiva de MPO e PR3 na membrana dos neutrófilos têm sido estudados. Pacientes com poliangiíte microscópica têm apresentado diferentes padrões de expressão de MPO na membrana dos neutrófilos e este aspecto parece estar relacionado ao risco de agudização da doença. Polimorfismos relacionados ao controle da produção de IL-10 e  $\alpha$ -1-antitripsina também têm sido observados em associação com o risco de agudização da poliangiíte microscópica (Sanders et al., 2004).

Na PAN, foram observadas mutações no gene da febre familiar do Mediterrâneo relacionadas a uma maior susceptibilidade para o

desencadeamento da doença em crianças. Acredita-se que estas mutações contribuem para o desenvolvimento de uma resposta imune-inflamatória exacerbada após exposição a determinados antígenos exógenos em alguns casos de PAN na infância (Yalçinkaya et al., 2007).

Os alelos HLA-DR são os alelos de classe II mais frequentemente associados às condições imunopatológicas, tais como a artrite reumatóide (Louzada-Júnior et al., 2008). Na PAN e na poliangiíte microscópica, a associação com os alelos HLA-DR tem sido relatada com resultados variáveis de acordo com a população estudada. Alguns destes estudos foram publicados antes do consenso de Chapel Hill e provavelmente avaliaram pacientes com poliangiíte microscópica em conjunto com pacientes com PAN. No presente estudo, foram avaliados pacientes com PAN e poliangiíte microscópica isoladamente e também em conjunto para permitir comparação com aqueles estudos mais antigos. Não encontramos associação entre os alelos HLA-DR e o diagnóstico de PAN ou poliangiíte microscópica na nossa casuística, mesmo quando essas doenças foram avaliadas em conjunto.

Não há estudos a respeito da associação entre um específico alelo HLA-DR e índices de atividade e gravidade de doença em pacientes com PAN e/ou poliangiíte microscópica.

O melhor *score* para avaliar a gravidade dos casos de PAN ou poliangiíte microscópica é o FFS. Guillevin et al. (1996) desenvolveram o FFS com o intuito de melhor caracterizar o prognóstico de pacientes com PAN ou poliangiíte microscópica por ocasião do diagnóstico da doença, identificando-se desta forma aqueles que requerem uma terapia inicial mais agressiva. Este *score* tem

orientado o tratamento para a introdução de corticosteróides em associação com a ciclofosfamida nos casos que apresentam FFS  $\geq 1$ . De acordo com esse parâmetro, recomenda-se que os pacientes com FFS=0 sejam tratados apenas com corticosteróides. Entretanto, na prática clínica diária, a utilização desse *score* exige cautela, pois muitos pacientes com FFS=0 também necessitam de citostático para o controle da doença, e 12% destes casos evoluíram para o óbito em até cinco anos após o diagnóstico (Guillevin et al., 1996). Outra limitação desse *score* é o não reconhecimento da hemorragia pulmonar que é uma manifestação potencialmente letal da poliangiíte microscópica e que também exige um tratamento agressivo (Langford, 2001).

Por sua vez, o BVAS é um índice de avaliação de atividade de doença utilizado em pacientes com vasculites sistêmicas primárias para melhor caracterizar a evolução clínica e monitorizar a resposta terapêutica, identificando-se desta forma os casos que requerem ajustes no tratamento. No entanto, se considerarmos que um maior BVAS correlaciona-se com doença mais disseminada, podemos especular também que um maior BVAS pode estar relacionado com doença mais agressiva (Luqmani et al., 1994).

Nós escolhemos para a análise do BVAS o ponto de corte em 22 e para o FFS em 1; estas escolhas foram baseadas no relato de Guillevin et al. (1999) que avaliaram o BVAS e o FFS em 85 pacientes com poliangiíte microscópica e encontraram uma maior taxa de sobrevida, em cinco anos após o diagnóstico, nos casos com FFS=0 e BVAS < 23.

Papasteriades et al. (1997) descrevem cinco de seis pacientes com poliangiíte microscópica e doença renal rapidamente progressiva não responsiva ao tratamento, positivos para HLA-DR5 e sugerem que este HLA pode estar relacionado à doença mais grave. No nosso grupo total de pacientes, uma maior frequência de DRB1\*11 e/ou DRB1\*12, alelos previamente tipados como HLA-DR5, relacionou-se com o acometimento do trato gastrintestinal, uma manifestação clínica potencialmente grave da PAN/poliangiíte microscópica. Os alelos DRB1\*13 e B3 também apresentaram uma maior frequência nos pacientes com acometimento do trato gastrintestinal no grupo total de casos.

No grupo total de casos, encontramos também uma maior frequência de HLA-DRB1\*16 e B4\*01 naqueles pacientes com doença mais disseminada mensurada pelo BVAS por ocasião do diagnóstico. Por outro lado, HLA-DRB1\*03 foi mais frequente naqueles pacientes com doença mais leve. O DRB1\*03, previamente tipado como DR3, é o HLA que se mostrou menos frequente nos casos de PAN e poliangiíte microscópica em estudos prévios, o que levou os autores a especular que ele pode representar um fator de proteção contra o desencadeamento destas doenças (Boki et al., 1997; Papasteriades et al., 1997). Nossos resultados sugerem uma possível participação do DRB1\*03 como fator de proteção contra o desencadeamento de uma doença mais agressiva na nossa população. O contrário pode ser verdadeiro para os alelos DRB1\*16 e B4\*01 que podem representar fatores de risco para o desenvolvimento de uma doença mais grave na nossa população.

Os alelos DRB1\*15 e/ou B1\*16 e B5 apresentaram uma maior frequência nos pacientes com envolvimento renal no grupo total de casos. O envolvimento renal

comprovadamente contribui para um pior prognóstico nos indivíduos com PAN ou poliangiíte microscópica.

Nossos resultados sugerem que os alelos DRB1\*15/B1\*16, B4\*01, B1\*03, B1\*11/DRB1\*12, B1\*13, B3 e B5 podem ter influência na expressão clínica da PAN/poliangiíte microscópica, bem como no prognóstico dos nossos pacientes.

A poliangiíte microscópica é considerada uma vasculite sistêmica primária predominantemente de pequenos vasos associada ao ANCA. Este grupo inclui também a granulomatose de Wegener e a síndrome de Churg-Strauss. A poliangiíte microscópica difere daquelas outras duas por apresentar uma histopatologia inflamatória não-granulomatosa e uma menor frequência do ANCA. O pequeno número de pacientes com poliangiíte microscópica da nossa amostra pode limitar o valor de nossos resultados; apesar disto, nós encontramos uma maior frequência do DRB1\*15 nos pacientes com BVAS  $\geq 22$  e FFS  $\geq 1$  e sugerimos que este HLA pode estar associado a um espectro de doença mais agressiva nos casos de poliangiíte microscópica na nossa população. Esta associação talvez indique uma possível apresentação preferencial de peptídeos antigênicos via HLA-DR para células T específicas como parte do processo de ativação da doença.

Nós observamos também uma maior frequência dos alelos DRB1\*15/B1\*16 e B5 nos pacientes com poliangiíte microscópica e envolvimento renal. Anteriormente, a frequência de envolvimento renal na poliangiíte microscópica era apontada como sendo de 100%, isto porque as séries de pacientes estudados eram provenientes exclusivamente de serviços de nefrologia; porém, aproximadamente 20% dos casos podem evoluir sem evidências clínicas de

envolvimento renal (Guillevin et al., 1999). Agard et al. (2003) encontraram acometimento renal por ocasião do diagnóstico em 45% de 36 casos de poliangiíte microscópica estudados; esta frequência é semelhante à encontrada na nossa amostra na qual observamos uma frequência de 40% de envolvimento renal por ocasião do diagnóstico.

Outro dado interessante observado por nós é a associação entre os alelos DRB1\*11 e/ou B1\*12 e a negatividade para o ANCA nos pacientes com poliangiíte microscópica. Spencer et al. (1992) encontraram uma associação positiva entre DR2 e a persistência do ANCA positivo em um grupo de 49 pacientes portadores de granulomatose de Wegener ou poliangiíte microscópica, mesmo após a instituição de um tratamento adequado, e sugerem uma possível relação entre o HLA e a síntese do ANCA; estes autores, no entanto, não sugerem nenhum mecanismo fisiopatológico que explique este achado e reconhecem a necessidade da realização de outros estudos para confirmação ou não deste dado, devido ao pequeno número de pacientes estudados. Por sua vez, Stassen et al. (2009) não encontraram nenhuma associação entre quaisquer dos alelos DR e a persistência ou não do ANCA positivo durante o primeiro ano de acompanhamento do tratamento de 304 pacientes portadores de AASV. Até o presente momento, os estudos não confirmaram uma associação definitiva entre o ANCA e os alelos HLA-DR na poliangiíte microscópica. Vietinghoff et al. (2006) sugerem que os alelos HLA são os responsáveis pela influência genética na expressão de PR3 na membrana de neutrófilos nos casos de granulomatose de Wegener, a forma mais comum de vasculite associada ao ANCA. Em contraste, na poliangiíte microscópica, o antígeno ANCA geralmente envolvido é a MPO e

não a PR3. A relação entre a MPO e os alelos HLA é um aspecto que merece futuros estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desencadeamento da poliangiíte microscópica.

Com relação aos casos de PAN, não encontramos nenhuma associação com os alelos HLA-DR. Quanto à análise dos dois casos de PAN associada ao vírus da hepatite B acreditamos ser importante relatar: em extensa revisão da literatura, Singh et al. (2007), descrevem os dados existentes a respeito da relação entre os alelos HLA-DR e a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV); HLA-DR 13 está consistentemente associado com a eliminação do HBV após a infecção aguda na maioria das populações estudadas; por outro lado, HLA-DR B1\*11/B1\*12 estão associados com a persistência do vírus B e evolução para infecção crônica na maioria das populações estudadas. Um de nossos dois pacientes com diagnóstico de PAN associada ao vírus da hepatite B mostrou-se positivo para DRB1\*11. Os outros alelos encontrados nestes dois casos não apresentam nenhuma das relações com o HBV descritas na literatura. Quanto à hepatite C, os alelos HLA-DR B1\*03 e B1\*07 apresentam uma associação consistente com a susceptibilidade ao HCV, infecção crônica e doença hepática mais grave em diversas populações. HLA-DR B1\*11/B1\*12 estão associados com a eliminação do HCV após infecção aguda e doença hepática menos grave na maioria dos grupos étnicos estudados. HLA-DR3 apresenta associação com a formação de crioglobulinas na hepatite C crônica (Singh et al., 2007). Por sua vez, Cacoub et al. (2001) estudaram pacientes com vasculite associada ao HCV e observaram uma maior frequência de HLA-DR11 nestes casos; sugerem que este HLA pode

atuar no mecanismo de *clearance* do HCV, aumentando o risco de desenvolvimento de vasculite nestes casos.

O presente estudo avaliou indivíduos com fenótipo caucasóide. Afrodescendentes e asiáticos não foram incluídos na nossa casuística. Nós reconhecemos as limitações existentes quando se tenta classificar de acordo com a raça, os indivíduos da nossa população, reconhecidamente miscigenada; entretanto, acreditamos que esta constatação não invalida os nossos resultados.

Outra restrição que pode ser considerada como relacionada ao nosso estudo é o pequeno número de indivíduos com diagnóstico de PAN/poliangiíte microscópica avaliados; entretanto, tanto a PAN quanto a poliangiíte microscópica são doenças raras, fato evidente não apenas na nossa população, mas também mundialmente.

Acreditamos que este estudo é uma contribuição válida, pois não há respostas definitivas a respeito de uma possível relação entre os antígenos HLA e as vasculites sistêmicas primárias. Investigar esta relação é importante não apenas do ponto de vista etiopatogênico, mas, principalmente, do ponto de vista clínico, avaliando-se uma possível correlação com os parâmetros clínicos, na tentativa de se identificar os pacientes com uma doença mais grave antes de se iniciar a terapêutica, buscando-se assim um tratamento mais adequado.

Acreditamos também que o presente estudo em conjunto com todos os outros realizados até o momento, podem representar um guia para a realização de futuras investigações, em especial aquelas que poderão clarificar os mecanismos fisiopatológicos através dos quais os alelos HLA podem influir no desencadeamento e/ou na evolução destes casos.

## **6.CONCLUSÕES**

1. Não houve associação entre os alelos HLA-DR e o diagnóstico de PAN e poliangiíte microscópica na nossa população.

2. Nossos resultados sugerem que os alelos HLA-DRB1\*15/B1\*16, B4\*01, B1\*03, B1\*11/B1\*12, B1\*13, B3 e B5 podem influenciar a expressão clínica da PAN e da poliangiíte microscópica na nossa população.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 2.ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 1994.
- Agard C, Mouthon L, Mahr A, Guillevin L. Microscopic Polyangiitis and Polyarteritis Nodosa: How and When Do They Start? Arthritis Rheum 2003; 49:709-15.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cell in their social context (Part IV): Molecular Biology of the Cell. 4.ed. Taylor e Francis, 2002.
- Al-Bishri J, Le Riche N, Pope JE. Refractory polyarteritis nodosa successfully treated with infliximab. J Rheumatol 2005; 32:1371-3.
- Baker AL, Kaplan MM, Benz WC, Sidel JS, Wolfe HS. Polyarteritis associated with Australia antigen positive hepatitis. Gastroenterology 1972; 62:105-10.
- Barbiano Di Belgiojoso G, Genderini A, Sinico RA, Radice A, Landriani N, Lagona C, et al. Acute renal failure due to microscopic polyarteritis with the same histological and clinical patterns in a father and his son. Contrib Nephrol 1991; 94:107-14.
- Barrera P, Boerbooms AMTH, Van De Putte LBA, Van Der Meer JWM. Effects of antirheumatic agents on cytokines. Semin Arthritis Rheum 1996; 25:234-53.
- Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of class II major histocompatibility complex molecules. Ann Rev Biochem 1990; 59:253-88.

- Blanco R, Martinez-Taboada UM, Rodriguez-Valverde V, Garcia F. Cutaneous vasculitis in children and adults: associated diseases and etiologic factors in 303 patients. *Medicine* 1998; 77:403-18.
- Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Mcshane DJ, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis: patients and methods. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1068-73.
- Boki KA, Dafni U, Karpouzas GA, Papasteriades C, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Necrotizing vasculitis in Greece: clinical, immunological And immunogenetic aspects. A study of 66 patients. *Br J Rheumatol* 1997; 36:1059-66.
- Booth A, Harper L, Hammad T, Bacon P, Griffith M, Levy J et al. Prospective study of TNF $\alpha$  blockade with infliximabe in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:717-21.
- Borgmann S, Haubitz M. Genetic impact of pathogenesis and prognosis of ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22 (Suppl. 36):S-79-86.
- Brodsky FM, Lem L, Bresnaham PA. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 1996; 47:464-71.
- Cacoub P, Renou C, Kerr G, Hue S, Rosenthal E, Cohen P et al. Influence of HLA-DR phenotype on the risk of hepatitis C virus-associated mixed crioglobulinemia. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2118-24.
- Calabrese LH. The rheumatic manifestations of infection with the human immunodeficiency virus. *Sem Arthritis Rheum* 1989; 18:225-39.
- Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunology Today* 1993; 14:349-52.

- Conde RA. Frequência dos alelos do HLA-B27 em pacientes com espondilite anquilosante e controles saudáveis (Tese – Doutorado) Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
- Conn DL. Polyarteritis. In: Klippel JH. e Dieppe PA, ed. heumatology. London, Mosby, 1994. Section 6, chapter 17, p. 1-10.
- Cupps TR. Vasculitis: epidemiology, pathology and pathogenesis. In: Schumacher HR, ed. Primer on the rheumatic diseases. 10.ed. Atlanta, Arthritis Foundation, 1993. p.136-40.
- Dausset J. HLA complexe majeur d'histocompatibilite de l'homme. 1.ed. Paris, Flammarion Médecine Sciences, 1985.
- Day CJ, Hewins P, Savage COS. New developments in the pathogenesis of ANCA-associated vasculites. Clin Exp Rheumatol 2003; 21(Suppl. 32):S35-48.
- Edgar JDM. The clinical utility of ANCA positivity. Ann Rheum Dis 1996; 5:494-6.
- Elkon KB, Sutherland DC, Rees AJ, Hughes GRV, Batchelor JR. HLA antigen frequencies in systemic vasculitis: increase in HLA-DR2 in Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum 1983; 26:102-5.
- Fernandes SRM. Poliarterite nodosa: contribuição ao estudo clínico, laboratorial, histopatológico e angiográfico (Tese – Doutorado). Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1993.
- Fernandes SRM, Bertolo MB, Rossi CL, Samara AM, Bonon SHA, Durante P, et al. Polyarteritis Nodosa and cytomegalovirus: diagnosis by polymerase chain reaction. Clin Rheumatol 1999; 18:501-3.

- Fernandes SRM, Costallat LTL, Amstalden EMI, Samara AM. Poliarterite nodosa: contribuição ao estudo clínico, histopatológico e laboratorial. Rev Bras Reumatol 1997; 37:194-200.
- Fernandes SRM, Costallat LTL, Zanardi VA, Samara AM. Avaliação da angiografia renal na poliarterite nodosa. Rev Bras Reumatol 1995; 35:17-21.
- Fietta P. Systemic vasculitides: Immunogenetics and familial clustering. Clin Exp Rheumatol 2004; 22:238-51.
- Fink CW. The role of the streptococcus in poststreptococcal reactive arthritis and childhood polyarteritis nodosa. J Rheumatol 1991; 18(suppl 29):14-20.
- Franssen CF, Ter Maaten JC, Hoorntje SJ. Brother and sister with myeloperoxidase associated autoimmune disease. Ann Rheum Dis 1994; 53:213.
- Freire AL. Dosagem sérica da interleucina-8 em pacientes portadores de doença de Behçet e poliarterite nodosa (Dissertação). Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2000.
- Freire AL, Bertolo MB, Pinho Jr AJ, Samara AM, Fernandes SRM. Increased serum levels of interleukin-8 in polyarteritis nodosa and Behçet's disease. Clin Rheumatol 2004; 23:203-205.
- Garcia-Porrúa C, Gonzales-Gay MA. Bacterial infection presenting as cutaneous vasculitis in adults. Clin Exp Rheumatol 1999; 17:471-3.
- Gayraud M, Guillevin L, Le Toumelin P, Cohen P, Lhote F, Casassus P et al. Long-Term Followup of polyarteritis Nodosa, Microscopic Polyangiitis, and Churg-Strauss Syndrome. Analysis of four prospective trials including 278 patients. Arthritis rheum 2001; 44:666-75.

-Gencik M, Borgmann S, Zahn R, Albert E, Sitter T, Epplen JT, et al. Immunogenetic risk factors for anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:412-7.

-Guillevin L, Cohen P, Mahr A, Arene J, Mouthon L, Puéchal X, et al. Treatment of polyarteritis nodosa and microscopic polyangiitis with poor prognosis factors: A prospective trial comparing glucocorticoids and six or twelve cyclophosphamide pulses in sixty-five patients. *Arthritis Rheum* 2003; 49:93-100.

-Guillevin L, Durand-Gasselien B, Cevallos R, Gayraud M, Lhote F, Callard P, et al. Microscopic polyangiitis - Clinical and laboratory findings in eighty-five patients. *Arthritis Rheum* 1999; 42:421-30.

-Guillevin L, Fechner J, Godeau P, Bletry O, Wechsler B, Herremans G, et al. Périartérite noueuse: étude clinique et thérapeutique de 126 malades étudiés en 23 ans. *Ann Med Int* 1985; 136:6-12.

-Guillevin L, Jarrousse B, Lok C, Lhote F, Jais JP, Du DLTH, et al. Longterm follow-up after treatment of polyarteritis nodosa and Churg-Strauss angiitis with comparison of steroids, plasma exchange and cyclophosphamide to steroids and plasma exchange: a prospective randomized trial of 71 patients. *J Rheumatol* 1991; 18:567-74.

-Guillevin L, Lhote F, Gayraud M, Cohen P, Jarrousse B, Lortholary O, et al. Prognostic factors in polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome: a prospective study in 342 patients. *Medicine* 1996; 75:17-28.

- Guillevin L, Lhote F, Jarrousse B, Fain O. Treatment of polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome. A meta-analysis of a 3 prospective controlled trials including 182 patients over 12 years. *Ann Med Interne* 1992; 143:405-16.
- Guillevin L, Mahe A, Cohen P, Larroche C, Queyrel V, Loustaud-Ratti V et al. Short term corticosteroids, lamivudine and plasma exchanges to treat hepatitis B virus related polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum* 2004; 51:482-7.
- Hagen EC, Stegeman CA, D'amaro J, Schereuder GMT, Lems SPM, Tervaert JWC, et al. Decreased frequency of HLA-DR13DR6 in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 1995; 48:801-5.
- Harris R, Jones HP. Polyarteritis nodosa in identical twins. *Ann Phys Med* 1970; 10:241-2.
- Haubitz M. ANCA-associated vasculitis: diagnosis, clinical characteristics and treatment. *Vasa* 2007; 36:81-9.
- Haynes BF. Vasculitis: pathogenic mechanisms of vessel damage in inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R ed. - *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York, Raven, 1992. p. 921.
- Hellmich B, Flossmann O, Gross W, Bacon P, Cohen-Tervaert J, Guillevin L, et al. EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:605-17.
- Heuze-Claudot L, Leroy B, Chevaller A, Noel LH, Can D, Danel P, et al. A familial ANCA-associated pulmonary-renal syndrome. *Clin Exp Immunol* 1993; 93(suppl 2):S40.

- Hunder GG, Arend WP, Bloch DA, Calabrese LH, Fauci AS, Fries JF, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for classification of vasculitis: introduction. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1065-7.
- Janeway CH, Travers P. *Immunobiology*. 1.ed. New York, Garland Publishing Inc, 1994.
- Jayne D. Challenges in the management of microscopic polyangiitis: past, present and future. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20:3-9.
- 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; 37:187-92.
- Jennette JC, Thomas DB, Falk RJ. Microscopic polyangiitis (microscopic polyarteritis). *Semin Diagn Pathol* 2001; 18:3-13.
- Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:75-9.
- Karp DR, Kantor OS, Halverson JD, Atkinson JP. Successful management of catastrophic gastrointestinal involvement in polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum* 1988; 31:683-7.
- Keogh KA, Wylam ME, Stone JH, Specks U. Induction of remission by B lymphocyte depletion in eleven patients with refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:262-8.
- Krupa WM, Dewan M, Jeon MS, Kurtin P, Young BR, Goronzy JJ et al. Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *Am J Pathol* 2002; 161:1815-23.
- Langford CA. Treatment of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome: where do we stand? *Arthritis Rheum* 2001; 44:508-12.

- Langford CA, Sneller MC. Biologic therapies in the vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:3-10.
- Leavitt RY, Fauci AS. Pulmonary vasculitis. *Am Rev Resp Dis* 1986; 134:149-56.
- Leff R, Harrer WV, Baylis JC, Jackson L, Faber K. Polyarteritis nodosa in two siblings. *Am J Dis Child* 1971; 121:67-70.
- Lehmann HW, Von Landenberg P, Modrow S. Parvovirus B19 infection and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* 2003; 2: 218-223.
- Leib ES, Hibravi H, Chia D, Blaker RG, Barnett ES. Correlation of disease activity in systemic necrotizing vasculitis with immunecomplexes. *J Rheumatol* 1981; 8:258-64.
- Lhote F, Cohen P, Guillevin L. Polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome. *Lupus* 1998; 7:238-58.
- Lie JT. Nomenclature and classification of vasculitis: plus ça change, plus c'est la même chose. *Arthritis Rheum* 1994; 37:181-6.
- Lightfoot RW, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Zvaifler NJ, Mcshane DJ, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1088-93.
- Lightfoot RW. Overview of the inflammatory vascular diseases. In: Klippel JH, Dieppe PA, ed. *Rheumatology*. London, Mosby, 1994. Section 6, chapter 16, p. 1-6.
- Longley S, Caldwell JR, Panush RS. Paraneoplastic vasculitis: unique syndrome of cutaneous angiitis and arthritis associated with myeloproliferative disorders. *Am J Med* 1986; 80:1027-30.

- Louzada-Júnior P, Freitas MVC, Oliveira RDR, Deghaide NHS, Conde RA, Bertolo MB et al. A majority of Brazilian patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1 alleles carry both the HLA-DRB1 shared epitope and anti-citrullinated peptide antibodies. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41:493-9.
- Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *Q J Med* 1994; 87:671-8.
- Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens* 2002; 60:407-64.
- Mason JC, Cowie MR, Davies KA, Schofield JB, Cambridge J, Walport MJ. Familial polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1249-53.
- Mendonça LLF. Anticorpo contra célula endotelial na doença mista do tecido conectivo como marcador de atividade clínica (Tese – Doutorado). São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1995.
- Nepom BS, Nepom GT. Polyglot and Polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995; 38:1715-21.
- Nowack R, Lehmann H, Flores-Suárez LF, Nanhou A, Van Der Woude FJ. Familial occurrence of systemic vasculitis and rapidly progressive glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1999; 34:364-73.
- Papasteriades C, Hatziyannakos D, Siakotos M, Pappas H, Tarassi K, Nikolopoulou N, et al. HLA antigens in microscopic polyarteritis with renal involvement. *Dis Markers* 1997; 13:117-22.
- Reveille JD, Goodman RE, Barger BO, Acton RT. Familial polyarteritis nodosa: a serologic and immunogenetic analysis. *J Rheumatol* 1989; 16:181-5.

- Robinson DM, Nepom GT. The major histocompatibility complex and disease susceptibility. *Immunol Allergy Clin North Am* 1993; 13:255-72.
- Robson J, Waller MJ, Parham P, De Groot N, Bontrop R, Kennedy L. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research* 2003; 31:311-4.
- Ross SC, Densen P. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine* 1984; 63:243.
- Rottem M, Frances MC, Fauci AS, Hoffmam GS. Familial Vasculitis: report of 2 families. *J Rheumatol* 1994; 21:561-3.
- Russel KA, Specks U. Are antineutrophil cytoplasmic antibodies pathogenic? Experimental approaches to understand the antineutrophil cytoplasmic antibody phenomenon. *Rheum Dis Clin N Am* 2001; 7:815-32.
- Sanders JSF, Stassen PM, van Rossum AP, Kallenberg CGM, Stegeman CA. Risk factors for relapse in ANCA-associated vasculites: Tools for treatment decisions? *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(Suppl 36):S94-101.
- Schneider MS, Goldman, PS. On familial polyarteritis nodosa. *Sov Med* 1962; 25:141-3.
- Schultz DR, Tozman EC. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: major autoantigens, pathophysiology, and disease associations. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 25:143-59.
- Segelmark M, Selga D. The challenge of managing patients with polyarteritis nodosa. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19:33-8.

- Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C infections across global populations. *World J Gastroenterol* 2007; 13:1770-87.
- Smith KGC, Jones RB, Burns SM, Jayne DRW. Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis. Remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2970-82.
- Sneller MC, Fauci AS. Pathogenesis of vasculitis syndromes. *Med Clin North Am* 1997; 81:221-42.
- Speck U. ANCA subsets: influence on disease phenotype. *Cleve Clin J Med* 2002; 69(Suppl 2):SII56-9.
- Spencer SJW, Burns A, Gaskin G, Pusey CD, Rees AJ. HLA class II specificities in vasculitis with antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *Kidney Int* 1992; 41:1059-63.
- Stassen P, Cohen-Tervaert JW, Lems SPM, Hepkema BG, Kallenberg CGN, Stegeman C. HLA-DR4, DR13 (6) and the ancestral haplotype A1B8DR3 are associated with ANCA-associated vasculitis and Wegener's granulomatosis. *Rheumatology Advance Access published March 31, 2009.*
- Stassen P, Sanders J, Lems S, Cohen-Tervaert JW, Stegeman C. HLA-DR antigens are associated with ANCA-associated vasculitis and relapse during follow up in PR3 but not in MPO-ANCA related vasculitis. *Kidney Blood Press Res* 2003; 26:277.
- Strachan T. Molecular genetics and polymorphism of class I antigens. *Br Med Bull* 1987; 43:1-14.

- Sundy JS, Haynes BF. Pathogenic mechanisms of vessel damage in vasculitis syndromes. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 22:861-81.
- Thomson J, Hulse D, Galbraith I, McKay I, Field M. Autoantibody associations with MHC class II antigens in scleroderma and autoimmune vasculitis. *Autoimmunity* 1994; 19:265-69.
- Trepo CG, Zuckerman AJ, Bird RC, Prince G. The role of circulating hepatitis B antigen/antibody immune complexes in the pathogenesis of vascular and hepatic manifestations in polyarteritis nodosa. *J Clin Pathol* 1974; 27:863-8.
- Trowsdale J, Young JAT, Kelly AP, Austin PJ, Carson S, Meunier H, et al. Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region. *Immunol Rev* 1985; 85:5-9.
- Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, et al. Genetic background of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: association of HLA-DRB1\*0901 with microscopic polyangiitis. *J Rheumatol* 2003; 30:1534-40.
- Turakhia AK, Khan MA. Splinter hemorrhages as a possible clinical manifestation of cholesterol crystal embolization. *J Rheumatol* 1990; 17:1083-6.
- Varani J, Mulligan MS, Ward PA. The vascular endothelium and acute inflammation. In: Klippel JH, Dieppe PA, ed. *Rheumatology*. London, Mosby, 1994. Section 3, chapter 11, p. 1-12.
- Vassilopoulos D, Younossi ZM, Hadziyannis E, Boparai N, Yen-Lieberman B, His E, et al. Study of host and virological factors of patients with chronic HCV infection and associated laboratory or clinical autoimmune manifestations. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21 (suppl 32): S100-S111.

- Watts RA, Gonzales-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Bentham G, Scott DGI. Geoepidemiology of systemic vasculitis: comparison of the incidence in two regions of Europe. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:170-2.
- Weyand C, Goronzy JJ. Mechanisms of disease: Medium and large vessels vasculites. *N Engl J Med* 2003; 349:160-9.
- Wiik AS. Clinical use of serological tests for antineutrophil cytoplasmic antibodies. What do the studies say? *Rheum Dis Clin N Am* 2001; 27:799-813.
- Yalçinkaya F, Ozçakar ZB, Kasapçopur O, Oztürk A, Akar N, Bakkaloglu A et al. Prevalence of MEFV gene mutations in childhood polyarteritis nodosa. *J Pediatr* 2007; 151:675-8.
- Zaleski MB. Cell-surface molecules in the regulation of immune responsiveness. *Immunol Invest* 1991; 20:103-31.
- Zhang L, Jayne D, Zhao M, Lockwood C, Oliveira D. Distribution of MHC class II alleles in primary systemic vasculitis. *Kidney Int* 1995; 47:294-8.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1- BVAS:

Nome:

HC:

Data:

Valor BVAS:

<b>1. MANIFESTAÇÕES GERAIS:</b>	
Nenhuma	0
Astenia	1
Mialgias	1
Artralgias/Artrite	1
Febre (< 38.5°C)	1
Febre (> 38.5°C)	2
Emagrecimento (1-2 kg)	2
Emagrecimento (> 2 kg)	3
Máximo score	3
<b>2. CUTÂNEAS:</b>	
Nenhuma	0
Infarto	2
Púrpura	2
Outras (livedo, nódulos)	2
Úlceras	4
Gangrena	6
Gangrena digital múltipla	6
Máximo score	6
<b>3. MUCOSAS/OCULAR:</b>	
Nenhuma	0
Úlceras orais	1
Úlceras genitais	1
Conjuntivite	1
Episclerite	2
Uveíte	6
Exsudato retiniano	6
Hemorragia retiniana	6
Máximo score	6
<b>5. TÓRAX:</b>	
Nenhuma	0
Dispnéia	2
Nódulos	2
Derrame pleural/pleurisia	4
Infiltrado	4
Hemoptise/hemorragia	4
Hemoptise intensa	6

Máximo score	6
<b>6. CARDIOVASCULAR:</b>	
Nenhuma	0
Sopros	2
Perda de pulsos	4
Insuficiência aórtica	4
Pericardite	4
Infarto miocárdico	6
Miocardiopatia	6
Máximo score	6
<b>7. ABDOMINAL:</b>	
Nenhuma	0
Dor abdominal	3
Enterorragia	6
Perfuração da vesícula biliar	9
Infarto intestinal	9
Pancreatite aguda	9
Máximo score	9
<b>8. RENAL:</b>	
Nenhuma	0
Hipertensão (diastólica > 90mmHg)	4
Proteinúria (> 1+ ou > 0.2 g/24 h)	4
Hematúria (>1+ ou > 10 células/ml)	8
Creatinina 125-249 µmol/l	8
Creatinina 250-499 µmol/l	10
Creatinina > 500 µmol/l	12
Aumento da creatinina > 10%	12
Máximo score	12
<b>9. SISTEMA NERVOSO:</b>	
Nenhuma	0
Confusão/demência	3
Convulsões (não hipertensivas)	9
Acidente vascular cerebral	9
Lesão medular	9
Neuropatia periférica	6
Mononeurite múltipla motora	9
Maximo score	9
<b>Máximo score total</b>	<b>63</b>

ANEXO 2 - FICHA PADRÃO:

DADOS CLÍNICOS:

DATA:

NOME:

HC:

SEXO:

IDADE:

A. MANIFESTAÇÕES GERAIS ( )

Febre ( )

Emagrecimento ( ) Kg meses

B. SISTEMA RETÍCULO-ENDOTELIAL ( )

Adenomegalia ( )

Hepatomegalia ( )

Esplenomegalia ( )

C. OSTEOARTICULAR ( )

Artralgia ( )

Artrite ( )

D. MUSCULAR ( )

Mialgia ( ) Dor em panturrilhas ( )

Fraqueza ( ) Tumefação ( )

E. NEUROLÓGICO ( )

SNC ( )

AVC ( ) Convulsões ( ) Outros ( )

Neuropatia periférica ( )

Mononeurite múltipla ( )

Polineuropatia ( )

Outros ( )

F. PELE ( )

Raynaud ( )

Nódulos ( )

Púrpura ( )

Úlceras ( )

Livedo reticular ( )

Outros ( )

G. PULMONAR ( )

Derrame pleural ( )

Infiltrado intersticial ( )

Infarto ( )

Atelectasia ( )

Outros ( )

H. CARDÍACO ( )

Arritmias ( )

Insuficiência cardíaca ( )

Miocardite ( )

Infarto miocárdico ( )

Pericardite ( )

Outros ( )

I. RENAL ( )

Hipertensão arterial ( )

Proteinúria ( )

Hematúria ( )

Insuficiência renal ( )

Outros ( )

J. GASTROINTESTINAL ( )

Dor abdominal ( )

Enterorragia ( )

Perfuração ( )

Outros ( )

K. TESTÍCULOS ( )

Dor ( )

Aumento de volume ( )

L. OCULAR ( )

Esclerite ( )

Vasculite retiniana ( )

Outros ( )

EXAMES COMPLEMENTARES:

- A. HEMOGRAMA ( ) Normal ( ) Anemia ( ) Leucocitose ( ) Plaquetose ( )
- B. VHS ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- C. URINA I ( ) Normal ( ) Hematúria ( ) Proteinúria ( )
- D. URÉIA ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- E. CREATININA ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- F. FAN ( ) Negativo ( ) Positivo ( )
- G. Fator reumatóide ( ) Negativo ( ) Positivo ( )
- H. Crioglobulinas ( ) Ausentes ( ) Presentes ( )
- I. ANCA ( ) Ausente ( ) Presente ( )
- J. SOROLOGIA HEPATITE B ( ) Negativa ( ) Positiva ( )
- K. SOROLOGIA HEPATITE C ( ) Negativa ( ) Positiva ( )
- L. SOROLOGIA HIV ( ) Negativa ( ) Positiva ( )
- M. TGO ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- N. TGP ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- O. CPK ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- P. LDH ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- Q. ELETRONEUROMIOGRAFIA ( ) Normal ( ) Miopatia ( ) Neuropatia ( )
- R. RX DE TÓRAX ( ) Normal ( ) Cardiomegalia ( ) Infiltrado ( ) Derrame ( ) Outros ( )
- S. ECG ( ) Normal ( ) Arritmias ( ) Infarto miocárdico ( ) Outros ( )
- T. ECOCARDIOGRAFIA ( ) Normal ( ) Pericardite ( ) Miocardite ( ) Outros ( )
- U. ECOGRAFIA ABDOME ( ) Normal ( ) Alterada ( )
- V. ARTERIOGRAFIA ( ) Normal ( ) Redução do lume ( ) Microaneurismas ( )
- W. HISTOPATOLÓGICO ( ) Normal ( ) Vasculite ( )

EXAMES COMPLEMENTARES:

- A. HEMOGRAMA ( ) Normal ( ) Anemia ( ) Leucocitose ( ) Plaquetose ( )
- B. VHS ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- C. URINA I ( ) Normal ( ) Hematúria ( ) Proteinúria ( )
- D. URÉIA ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- E. CREATININA ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- F. FAN ( ) Negativo ( ) Positivo ( )
- G. Fator reumatóide ( ) Negativo ( ) Positivo ( )
- H. Crioglobulinas ( ) Ausentes ( ) Presentes ( )
- I. ANCA ( ) Ausente ( ) Presente ( )
- J. SOROLOGIA HEPATITE B ( ) Negativa ( ) Positiva ( )
- K. SOROLOGIA HEPATITE C ( ) Negativa ( ) Positiva ( )
- L. SOROLOGIA HIV ( ) Negativa ( ) Positiva ( )
- M. TGO ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- N. TGP ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- O. CPK ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- P. LDH ( ) Normal ( ) Aumentada ( )
- Q. ELETRONEUROMIOGRAFIA ( ) Normal ( ) Miopatia ( ) Neuropatia ( )
- R. RX DE TÓRAX ( ) Normal ( ) Cardiomegalia ( ) Infiltrado ( ) Derrame ( ) Outros ( )
- S. ECG ( ) Normal ( ) Arritmias ( ) Infarto miocárdico ( ) Outros ( )
- T. ECOCARDIOGRAFIA ( ) Normal ( ) Pericardite ( ) Miocardite ( ) Outros ( )
- U. ECOGRAFIA ABDOME ( ) Normal ( ) Alterada ( )
- V. ARTERIOGRAFIA ( ) Normal ( ) Redução do lume ( ) Microaneurismas ( )
- W. HISTOPATOLÓGICO ( ) Normal ( ) Vasculite ( )

ANEXO 3 - Termo de consentimento informado:

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO  
INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de uma pesquisa clínica sobre poliarterite nodosa (PAN) e poliangiite microscópica. Esta folha de informação tem por objetivo fornecer-lhe maiores detalhes sobre este estudo, de tal forma que você possa decidir se deseja ou não participar do mesmo. Este estudo tem como objetivo estudar nas células dos pacientes e pessoas não portadoras dos distúrbios acima citados, a presença ou ausência de um componente que poderá estar ligado às doenças. É importante que você compreenda que não há riscos envolvendo este estudo, pois se trata apenas da coleta de amostras de sangue e o único desconforto será a picada da agulha para se coletar o sangue. O sigilo e a privacidade quanto aos dados confidenciais e resultados obtidos na pesquisa são garantidos e as amostras de sangue serão utilizadas somente para o fim proposto que é a extração do DNA para a identificação do componente. O benefício para os pacientes é a identificação de uma possível predisposição genética para as doenças, contribuindo assim com a realização de estudos futuros que ajudarão no tratamento. Os resultados obtidos ficarão à disposição do paciente em seu prontuário. Não haverá reembolso para alimentação/transporte, pois a coleta de sangue dos pacientes será realizada durante as consultas de rotina agendadas no ambulatório de reumatologia.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Para participar do estudo, você deve estar disposto a deixar realizar a coleta de sangue (duas amostras, 5 ml para cada amostra) e concordar com a utilização das amostras para a extração do seu DNA. Caso você tenha dúvidas referentes a esta avaliação, poderá consultar os médicos responsáveis pela pesquisa. Mesmo após o início do estudo, você poderá desistir dele em qualquer período.

TERMO DE PARTICIPAÇÃO E ASSINATURAS

Pesquisa: Alelos HLA-DR em pacientes com PAN e poliangiite microscópica

Responsáveis: Profa. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes

Dr. Alzirton de Lira Freire

Dados do paciente/controle

Nome

HC

Data de nascimento

RG

Idade

Endereço

Telefone

Eu, abaixo assinado, aceito participar voluntariamente de uma pesquisa para estudar em minhas células a presença ou ausência de um componente que pode estar ligado às doenças em questão. Estou ciente de que para participar deste estudo, autorizo a coleta de duas amostras de sangue, 5 ml para cada amostra. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre minhas dúvidas, oralmente. Entendi o propósito do estudo, e ausência de riscos, bem como os benefícios da minha aceitação em participar do mesmo. A minha assinatura, a seguir, indica que eu concordei em participar voluntariamente do estudo.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Eu, abaixo assinado, expliquei e discuti todos os detalhes relevantes deste estudo, usando uma linguagem compreensível e apropriada, e acredito que a explicação foi entendida.

\_\_\_\_\_  
Assinatura dos responsáveis e data.

Profa. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes

Dr. Alzirton de Lira Freire

Fone (19) 37887776 (ambulatório de reumatologia)

Comissão de Ética para reclamações: Fone (19) 37888936



## ANEXO 5 - Outros resultados:

**Tabela Alelos HLA-DR e manifestações clínicas (ausente/presente) nos casos (grupo total) (n=29)**

HLA-DR	Sintomas gerais (%)	Articular (%)	Muscular (%)	SNC (%)	SNP (%)	Pele (%)	Pulmonar (%)	Cardiovascular (%)	Ocular (%)
B1*01	30/21	10/32	10/32	17/50	15/31	14/27	28/0	23/33	25/20
B1*03	20/21	30/16	20/21	26/0	15/25	14/27	24/0	23/0	21/20
B1*04	20/21	20/21	20/21	22/17	15/25	43/13	24/0	23/0	25/0
B1*07	10/21	20/16	10/21	9/50	23/12	0/23	16/25	19/0	17/20
B1*08	10/5	10/5	10/5	4/17	8/6	14/5	8/0	8/0	8/0
B1*10	0/5	10/0	10/0	4/0	8/6	14/0	4/0	4/0	4/0
B1*11	40/26	30/32	40/26	26/50	31/31	29/32	28/50	27/67	29/40
B1*12	0/5	0/5	0/5	4/0	8/0	0/5	4/0	4/0	0/20
B1*13	10/16	10/16	10/16	17/0	23/6	29/9	12/25	11/33	17/0
B1*14	10/16	20/11	10/16	17/0	23/6	14/14	12/25	11/33	12/20
B1*15	20/16	10/21	10/16	17/17	23/12	0/23	16/25	15/33	12/40
B1*16	20/5	10/21	10/11	13/0	0/19	14/9	12/0	11/0	12/0
B3	60/63	60/63	60/63	65/50	0/19	57/64	60/75	58/100	58/80
B4*01	30/37	40/32	30/37	26/67	38/31	43/32	36/25	38/0	37/20
B5	30/21	20/26	30/21	26/17	23/25	14/27	24/25	23/33	21/40
B1*11/B1*12	40/32	30/37	40/32	30/50	38/31	29/36	32/50	31/67	30/60
B1*13/B1*14	20/21	20/21	20/21	26/0	38/6	29/18	16/50	15/67	21/20
B1*15/B1*16	30/21	20/26	30/21	26/17	23/25	14/27	24/25	23/33	21/40

\*P < 0,05

**Tabela PAN: Alelos HLA-DR e BVAS *versus* controles**

HLA-DR	BVAS $\geq$ 22 (n=09)	BVAS <22 (n=10)	Controles (n=59)
	n (%)	n (%)	n (%)
B1*01	4 (44)	1 (10)	12 (20)
B1*03	1 (11)	3 (30)	11 (19)
B1*04	3 (33)	2 (20)	20 (34)
B1*07	3 (33)	2 (20)	10 (17)
B1*08	0 (00)	2 (20)	6 (10)
B1*10	0 (00)	1 (10)	1 (2)
B1*11	3 (33)	2 (20)	16 (27)
B1*12	0 (00)	0 (00)	2 (3)
B1*13	0 (00)	1 (10)	11 (19)
B1*14	0 (00)	2 (20)	9 (15)
B1*15	1 (11)	1 (10)	6 (10)
B1*16	2 (22)	0 (00)	2 (3)
B3	4 (44)	6 (60)	43 (73)
B4*01	6 (67)	3 (30)	28 (47)
B5	3 (33)	1 (10)	8 (14)
B1*11/B1*12	3 (33)	2 (20)	18 (30)
B1*13/B1*14	0 (00)	2 (20)	19 (32)
B1*15/B1*16	3 (33)	1 (10)	8 (14)

**Tabela PAN: Alelos HLA-DR e FFS *versus* controles**

HLA-DR	FFS $\geq 1$ (n=9)	FFS =0 (n=10)	Controles (n=59)
	n (%)	n (%)	n (%)
B1*01	4 (44)	1 (10)	12 (20)
B1*03	0 (00)	4 (40)	11 (19)
B1*04	1 (11)	4 (40)	20 (34)
B1*07	4 (44)	1 (10)	10 (17)
B1*08	1 (11)	1 (10)	6 (10)
B1*10	0 (00)	1 (10)	1 (2)
B1*11	3 (33)	2 (20)	16 (27)
B1*12	0 (00)	0 (00)	2 (3)
B1*13	1 (11)	0 (00)	11 (19)
B1*14	1 (11)	1 (10)	9 (15)
B1*15	1 (11)	1 (10)	6 (10)
B1*16	1 (11)	1 (10)	2 (3)
B3	4 (44)	6 (60)	43 (73)
B4*01	5 (55)	4 (40)	28 (47)
B5	2 (22)	2 (20)	8 (14)
B1*11/B1*12	3 (33)	2 (20)	18 (30)
B1*13/B1*14	1 (11)	1 (10)	19 (32)
B1*15/B1*16	2 (22)	2 (20)	8 (14)

**Tabela Alelos HLA-DR e manifestações clínicas (ausente/presente) nos pacientes com PAN (n=19)**

HLA-DR	Sintomas gerais (%)	Articular (%)	Muscular (%)	SNC (%)	SNP (%)	Pele (%)	Pulmonar (%)	TGI (%)	Cardiovascular (%)	Renal (%)	Ocular (%)
B1*01	20/29	11/40	0/33	15/50	22/30	14/27	28/0	23/33	22/100	22/30	23/50
B1*03	20/21	22/20	25/20	31/0	11/30	14/27	22/0	23/17	22/0	22/20	23/0
B1*04	20/29	22/30	50/20	31/17	11/30	43/14	28/0	31/17	28/0	11/40	29/0
B1*07	20/29	22/30	25/27	15/50	11/30	0/23	22/100	31/17	28/0	33/20	23/50
B1*08	20/7	11/10	25/27	8/17	11/10	14/5	11/0	15/0	11/0	22/0	12/0
B1*10	0/7	11/0	25/0	8/0	0/10	14/0	55/0	8/0	55/0	11/0	6/0
B1*11	40/21	22/30	0/33	15/50	33/20	29/32	28/0	15/50	22/100	22/30	23/50
B1*12	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
B1*13	0/7	11/0	0/7	8/0	11/0	29/9	55/0	0/17	55/0	11/0	6/0
B1*14	20/7	22/0	0/13	15/0	22/0	14/14	11/0	8/17	11/0	22/0	12/0
B1*15	0/14	11/10	25/7	8/17	11/10	0/23	11/0	8/17	11/0	11/10	6/50
B1*16	20/7	11/10	0/13	15/0	0/20	14/9	11/0	15/0	11/0	0/20	12/0
B3	60/50	56/50	25/60	54/50	56/50	57/64	55/0	39/83	50/100	56/50	53/50
B4*01	40/50	44/50	75/40	38/67	56/40	43/32	44/100	54/33	50/0	33/60	47/50
B5	20/21	22/20	25/20	23/17	11/30	14/27	22/0	23/17	22/0	11/30	18/50
B1*11/B1*12	40/21	22/30	0/33	15/50	33/20	29/36	28/0	15/50	22/100	22/30	23/50
B1*13/B1*14	20/7	22/0	0/13	15/0	22/0	29/18	11/0	8/17	11/0	22/0	12/0
B1*15/B1*16	20/21	22/20	25/20	23/17	11/30	14/27	22/0	23/17	22/0	11/30	18/50

\*P < 0,05

**Tabela Alelos HLA-DR e manifestações clínicas (ausente/presente) nos pacientes com poliangiíte (n=10)**

HLA-DR	Sintomas gerais (%)	Articular (%)	Muscular (%)	SNC (%)	SNP (%)	Pele (%)	Pulmonar (%)	TGI (%)	Cardiovascular (%)	Ocular (%)
B1*01	40/0	0/22	17/25	0/0	0/33	0/25	28/0	25/17	25/0	28/0
B1*03	20/20	100/11	17/25	0/0	25/17	0/25	28/0	25/17	25/0	14/33
B1*04	20/0	0/11	0/25	0/0	0/17	0/12	14/0	25/0	12/0	14/0
B1*07	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
B1*08	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
B1*10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
B1*11	40/40	100/33	67/0	0/0	25/50	100/25	28/67	0/67	37/50	43/33
B1*12	0/20	0/11	0/25	0/0	25/0	0/12	14/0	25/0	12/0	0/33
B1*13	20/40	0/33	17/50	0/0	50/17	50/25	28/33	0/50	25/50	43/0
B1*14	0/40	0/22	17/25	0/0	25/17	0/25	14/33	25/17	12/50	14/33
B1*15	40/20	0/33	33/25	0/0	50/17	0/37	28/33	50/17	25/50	28/33
B1*16	20/0	0/11	17/0	0/0	0/17	0/12	14/0	25/0	12/0	14/0
B3	60/100	100/78	83/75	0/0	100/67	100/75	71/100	50/100	75/100	71/100
B4*01	20/0	0/11	0/25	0/0	0/17	0/12	14/0	25/0	12/0	14/0
B5	40/20	0/33	33/25	0/0	50/17	0/37	28/33	50/17	25/50	28/33
B1*11/B1*12	40/60	100/44	67/25	0/0	50/50	100/37	43/67	25/67	50/50	43/67
B1*13/B1*14	20/60	0/44	33/50	0/0	75/17	50/37	28/67	25/50	25/100	43/33
B1*15/B1*16	40/20	0/33	33/25	0/0	50/17	0/37	28/33	50/17	25/50	28/33

\*P < 0,05

**Tabela** Alelos HLA-DR nos pacientes e controles (p-value):

HLA-DR	Total (n=29) n (%)	PAN (n=19) n (%)	Poliangiíte (n=10) n (%)	Controles (n=59) n (%)	p
B1*01	7 (24)	5 (26)	2 (20)	12 (20)	0.920
B1*03	6 (21)	4 (21)	2 (20)	11 (19)	1.000
B1*04	6 (21)	5 (26)	1 (10)	20 (34)	0.291
B1*07	5 (17)	5 (26)	0 (00)	10 (17)	0.229
B1*08	2 (7)	2 (10)	0 (00)	6 (10)	0.733
B1*10	1 (3)	1 (5)	0 (00)	1 (2)	-
B1*11	9 (31)	5 (26)	4 (40)	16 (27)	0.687
B1*12	1 (3)	0 (00)	1 (10)	2 (3)	0.407
B1*13	4 (14)	1 (5)	3 (30)	11 (19)	0.184
B1*14	4 (14)	2 (10)	2 (20)	9 (15)	0.809
B1*15	5 (17)	2 (10)	3(30)	6 (10)	0.233
B1*16	3 (10)	2 (10)	1 (10)	2 (3)	0.235
B3	18 (62)	10 (53)	8 (80)	43 (73)	0.184
B4*01	10 (34)	9 (47)	1 (10)	28 (47)	0.079
B5	7 (24)	4 (21)	3 (30)	8 (14)	0.316
B1*11/B1*12	10 (34)	5 (26)	5 (50)	18 (30)	0.399
B1*13/B1*14	6 (21)	2 (10)	4 (40)	19 (32)	0.131
B1*15/B1*16	7 (24)	4 (21)	3 (30)	8 (14)	0.316