

JULIO MIRANDA GIL

Estudo da associação entre os alelos DR e DQ de antígenos de histocompatibilidade leucocitária (HLA) e pênfigo vulgar em pacientes brasileiros

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

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gil, Julio Miranda

Estudo da associação entre os alelos DR e DQ de antígenos de histocompatibilidade leucocitária (HLA) e pênfigo vulgar em pacientes brasileiros / Julio Miranda Gil. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Luiz Ubirajara Sennes.

Descritores: 1.Pênfigo 2.Antígenos HLA-A 3.Antígenos HLA-B 4.Antígenos HLA-C 5.Antígenos HLA-DR 6.Antígenos HLA-DQ 7.Genes classe I do complexo de histocompatibilidade (MHC) 8.Genes classe II do complexo de histocompatibilidade (MHC)

USP/FM/DBD-275/16

Esta Pesquisa recebeu subsídio financeiro da FAPESP – Fundação de
Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
Auxílio a Pesquisa Regular: Processo 2013/23678-2

Dedico ...

*À minha amada esposa **Gabriela**,*

pelo apoio incondicional, amor e exemplo de perseverança.

*Aos meus filhos, alegria da minha vida, **Andreia, Guilherme e Fernanda**,*

pela paciência e compreensão da minha ausência em alguns momentos.

*Aos meus pais, **Jacob e Lucia**, pelas lições de*

vida, confiança e incentivo depositados em mim em

todas etapas de minha vida.

*Às minhas queridas irmãs, **Patricia, Adriana e Beatriz**, por serem minhas*

eternas parceiras e por terem sempre confiado em seu irmão mais novo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ...

Ao **Prof. Dr. Ivan Dieb Miziara**, por todos os estimados ensinamentos em otorrinolaringologia, estomatologia e na área de pesquisa. Obrigado pela confiança e paciência em todo o percurso da pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, pelos conselhos e sugestões na etapa final da tese. Por me aceitar no Programa de Pós-Graduação em Otorrinolaringologia da FMUSP e pelo modo como conduz o Programa de Pós-Graduação.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, professor titular de Otorrinolaringologia da FMUSP, por ter me aberto todas as portas que precisei, desde a residência médica até os dias de hoje.

Ao **Dr. Helcio Rodrigues** e ao **Prof. Dr. Jorge Kalil**, sem os quais o trabalho não seria possível. Disponibilizaram o Laboratório de Imunologia do INCOR e auxiliaram em todos os meios possíveis.

À **Claudia Borba Rosales**, do Laboratório de Imunologia do InCor, por auxiliar na extração e tipificação de DNA, além de ter ensinado todo o processo detalhadamente inúmeras vezes.

Ao **Dr. Raimar Weber**, por me incentivar ao estudo de HLA em pacientes com Pênfigo Vulgar e me permitir realizar a continuidade do seu trabalho. Pela sua prontidão em me ajudar em todos os passos da tese.

Ao **Dr. Azis Arruda Chagury**, pelos conselhos, sugestões e parceria na tipificação e extração do DNA, assim como na descrição do processo.

Ao **Dr. Ali Mahmoud**, por ser um grande amigo, pelas experiências compartilhadas na área de Estomatologia, ajuda no desenvolvimento da pesquisa e por disponibilizar imagens que foram utilizadas na tese.

Às secretarias **Márcia, Luci e Marileide** pelo auxílio em todas os momentos que foi preciso. Sempre com muita generosidade e simpatia.

Aos **funcionários do Laboratório de Imunologia** do InCor, do departamento de Patologia e de Dermatologia do HC-FMUSP, pela parceria durante o período de realização desta pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo de doutorado direto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo financiamento na compra dos kits que viabilizaram o projeto.

Aos **pacientes** dos nossos ambulatórios que se prontificaram a participar do estudo e aceitaram a coleta de sangue.

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de Figuras e Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO	09
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 Biologia do epitélio e os desmossomos	12
3.2 Pênfigo vulgar	14
3.2.1 Epidemiologia	14
3.2.2 Aspectos clínicos	14
3.2.3 Diagnóstico	18
3.2.4 Fisiopatologia	20
3.2.4.1 Autoanticorpos antidesmossomos	20
3.2.4.2 Imunidade celular	21
3.2.5 Evidências de participação genética na susceptibilidade ao pênfigo vulgar	22
3.3 O complexo principal de histocompatibilidade e o sistema de antígeno leucocitário humano	23
3.4 Importância da identificação dos alelos associados ao PV para elucidação de sua fisiopatologia	25
3.5 Base estrutural para susceptibilidade ao pênfigo vulgar de portadores do alelo HLA DRB1*0402 e HLA DQB1*05:03	26
3.6 Associação entre outros alelos do sistema HLA e pênfigo vulgar .	27

3.7 Particularidades da formação da população brasileira	27
4 CASUÍSTICA E MÉTODO	29
4.1 Casuística	30
4.1.1 Pacientes	30
4.1.1.1 Critérios de inclusão	30
4.1.1.2 Critérios de exclusão	31
4.1.2 Controles	32
4.2 Método	32
4.2.1 Avaliação clínica e coleta de amostra de sangue periférico	32
4.2.2 Extração e tipificação de DNA	33
4.2.2.1 Extração de DNA de sangue periférico	33
4.2.2.2 Tipificação HLA pelo método PCR-SSO	35
4.3 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA A em pacientes com PV e controles	42
5.2 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA B em pacientes com PV e controles	44
5.3 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA C em pacientes com PV e controles	46
5.4 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DRB1 em pacientes com PV e nos controles	49
5.5 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DQA1 em pacientes com PV e os controles	51
5.6 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DQB1 em pacientes com PV e os controles	52
5.7 Prevalência dos haplótipos DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 e DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 em pacientes com PV e os controles	54
6 DISCUSSÃO	56
6.1 Desenho do estudo e composição dos grupos de casos e controles	57

LISTA DE SIGLAS

CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos em Pesquisa
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
InCor	Instituto do Coração da FMUSP
HC	Hospital das Clínicas

LISTA DE ABREVIATURAS

Dsg1	anti-desmogleína 1
Dsg3	anti-desmogleína 3
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HLA	antígeno leucocitário humano
IFD	imunofluorescência direta
IFI	imunofluorescência indireta
MHC	moléculas de histocompatibilidade
PBR	região ligadora de peptídeos
PCR	reação em cadeia da polimerase
PV	pênfigo vulgar
RNA	ácido ribonucleico
SSO	oligonucleotídeos sequência-específica

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Celsius
h	hora
kDa	quilodalton
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimol
nm	nanometro
μm	micrometro
rpm	rotações por minuto
s	segundo
α	alfa
β	beta
%	por cento
=	igual a
<	menor que
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
°	grau

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Estrutura molecular do desmossomo. As desmogleínas e as desmocollinas interagem entre si. (Dsg = desmogleínas; Dsc = desmocollinas; PG = plakoglobina; PKP = placofilina; DPK = desmoplaquina)	13
Figura 2	Diversidade de fenótipos de pênfigo: P. foliáceo e P. vulgar não são inflamatórios, enquanto o herpetiforme, vegetante e paraneoplásico são inflamatórios. Microscopia com imunofluorescência de P. foliáceo e P. vulgar mostraram depósito de IgG na superfície do queratinócito na camada superior e inferior, respectivamente	15
Figura 3	Manifestações clínicas: Lesão em mucosa jugal	16
Figura 4	Gengivite descamativa	17
Figura 5	Manifestações clínicas do pênfigo vulgar: cavidade oral – lesão avançada	17
Figura 6	Sinal de Nikolsky em paciente com diagnóstico de pênfigo vulgar.....	18
Figura 7	Peculiaridades para o diagnóstico de pênfigo vulgar. (A) Exame anatomopatológico que evidencia bolha intraepidérmica com nível de clivagem supra basal (setas). (B) imunofluorescência direta que mostra depósitos de IgG e C3 na superfície dos queratinócitos da epiderme	19
Figura 8	Estrutura das moléculas de HLA classe I e classe II. β -2-microglobulina é a cadeia leve da molécula de classe I. A cadeia α da molécula de classe I tem dois domínios de ligação a peptídeos: α 1 e α 2, um domínio	

semelhante à imunoglobulina α_3 , a região transmembrana (TM), e a cauda citoplasmática (*cytoplasmic tail*). Cada uma das cadeias, α e β , de classe II tem quatro domínios: o sítio de ligação a peptídeos (*peptide-binding domain*) (α_1 ou β_1), o domínio semelhante à imunoglobulina (α_2 ou β_2), a região transmembrana (TM) e a cauda citoplasmática (*cytoplasmic tail*). *Plasma membrane* = membrana citoplasmática..... 24

Figura 9	Buffers utilizados no laboratório de Imunologia do InCor para extração de DNA	34
Figura 10	Analisador de fluxo - LABScan™ 100	36
Figura 11	Streptavidina conjugada à Ficoeritrina-R – One Lambda, INC. fornecida pela FAPESP para a realização da tese	37
Figura 12	Tela de aquisição do <i>HLA fusion™ Analysis Software for Windows</i>	37
Gráfico 1	Razão de chances (<i>odds ratio</i> OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA A	44
Gráfico 2	Razão de chances (<i>odds ratio</i> OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA B	46
Gráfico 3	Frequências alélicas do HLA C em pacientes com pênfigo vulgar e controles	48
Gráfico 4	Razão de chances (<i>odds ratio</i> OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA C	48
Gráfico 5	Frequências alélicas do HLA DRB1 em pacientes com pênfigo vulgar e controles	50
Gráfico 6	Razão de chances (<i>odds ratio</i> OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA DRB1	50
Gráfico 7	Razão de chances (<i>odds ratio</i> OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA DQA1	52

Gráfico 8	Razão de chances (<i>odds ratio</i> OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA DQB1	54
Gráfico 9	Prevalência dos haplótipos DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 e DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 em pacientes com pênfigo vulgar e controles	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes do complexo principal de histocompatibilidade identificados em associação com pênfigo vulgar em diferentes populações	05
Tabela 2	Prevalência do alelo HLA <i>locus</i> DR nos indivíduos estudados em trabalho preliminar	07
Tabela 3	Características dos pacientes com pênfigo vulgar e os controles	40
Tabela 4	Sintomas otorrinolaringológicos dos pacientes com pênfigo vulgar	41
Tabela 5	Prevalência fenotípica dos alelos do HLA A para os pacientes com pênfigo vulgar e os controles	43
Tabela 6	Prevalência fenotípica dos alelos do HLA B para os pacientes com pênfigo vulgar e os controles	45
Tabela 7	Prevalência fenotípica dos alelos do HLA C para os pacientes com pênfigo vulgar e os controles	47
Tabela 8	Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DRB1 para os pacientes com pênfigo vulgar e os controles	49
Tabela 9	Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DQA1 de alta resolução para os pacientes com pênfigo vulgar e os controles	51
Tabela 10	Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DQB1 para os pacientes com pênfigo vulgar e os controles	53
Tabela 11	Prevalência dos haplótipos DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 e DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 para os pacientes com pênfigo vulgar e os controles	55

RESUMO

Gil JM. Estudo da associação entre antígenos de histocompatibilidade leucocitária (HLA) – DR e DQ – e pênfigo vulgar em pacientes brasileiros [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: Pênfigo Vulgar é uma doença bolhosa mucocutânea autoimune caracterizada pela formação de bolhas ou ulcerações dolorosas que afetam as superfícies cutâneas e/ou mucosas. A perda do contato célula-célula entre os queratinócitos do epitélio (acantólise) resulta na manifestação clínica do Pênfigo Vulgar. Autoanticorpos IgG se ligam às desmogleínas – anti-desmogleína 3 (Dsg3) e/ou anti-desmogleína 1 (Dsg1) – e são críticos na patogênese da doença. A predisposição genética ao PV, principalmente com alelos HLA DR e DQ, foi revelada desde a década de 80 e foi comprovada por análises genéticas e sorológicas, repetidas vezes. As características singulares da população brasileira favorecem estudos genéticos exploratórios. **PACIENTES E MÉTODO:** O grupo em estudo incluiu 51 pacientes com diagnóstico confirmado de Pênfigo Vulgar de um hospital terciário da cidade de São Paulo, estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Foi realizada a extração de DNA e a tipificação de HLA A, B, C, DR e DQ por meio de *kits* QIAGEN (QIAamp DNA Mini Kit®). O grupo controle foi composto a partir de um banco de dados de 297 doadores falecidos não relacionados da cidade de São Paulo, que foram tipados pelo mesmo método. Este banco faz parte do Sistema Estadual de Transplantes da Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo e contém a idade do paciente na coleta. O nível de significância dos testes estatísticos foi ajustado pela correção de Bonferroni, dependendo da quantidade de frequências fenotípicas avaliadas para o HLA A, HLA B, HLA C, HLA DRB1 e HLA DQB1. **RESULTADOS:** Os alelos HLA-B*57, HLA-C*15, HLA-DRB1*04:02, HLA-DRB1*08:04, HLA-DRB1*14:01, DQA1*03:01, DQB1*03:02 e o DQB1*05:03 estiveram associados com a susceptibilidade. Ambos os alelos HLA DRB1*04:02 e HLA-DRB1*14:01 e seus respectivos haplótipos DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 e DRB1*14-

DQA1*01:01-DQB1*05:03 conferiram risco à doença. **DISCUSSÃO:** Os alelos DRB1*04:02 e DQB1*05:03 estão associados com o Pênfigo Vulgar no presente estudo, bem como a diversas populações do mundo. A associação aqui estudada com o DRB1*08:04 foi confirmada por causa deste alelo específico e não do desequilíbrio de ligação a algum gene adjacente. A associação do alelo HLA-B*57 ao pênfigo vulgar é reportada pela primeira vez pelo presente estudo. **CONCLUSÕES:** Os alelos HLA-B*57, HLA-C*15, HLA-DRB1*04:02, HLA-DRB1*08:04, HLA-DRB1*14:01, DQA1*03:01, DQB1*03:02 e DQB1*05:03 estão associados ao Pênfigo Vulgar em pacientes brasileiros.

Descritores: pênfigo; antígenos HLA-A; antígenos HLA-B; antígenos HLA-C; antígenos HLA-DR; antígenos HLA-DQ; genes classe I do complexo de histocompatibilidade (MHC); genes classe II do complexo de histocompatibilidade (MHC).

ABSTRACT

Gil JM. Study of the association between human leukocyte antigens (HLA) – DR and DQ – and pemphigus vulgaris in Brazilian patients [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

BACKGROUND: Pemphigus vulgaris is a mucocutaneous blistering autoimmune disease that manifests as painful blisters or ulcerations on the skin and/or mucosal surfaces. The loss of cell-cell adhesion among the epithelial keratinocytes (acantholysis) leads to pemphigus vulgaris clinical findings. IgG autoantibodies target desmoglein – anti-Desmoglein 3 (Dsg3) and/or 1 (Dsg1) - play a major role in the disease pathogenesis. Genetic predisposal to pemphigus vulgaris, especially the HLA DR and DQ alleles, was revealed since the 80s and has been proven through genetic and serologic analysis repeatedly. The unique constitution of the Brazilian population favours genetics exploratory studies. **PATIENTS AND METHODS:** The study group included fifty-one patients with confirmed diagnosis of Pemphigus Vulgaris from a tertiary hospital in Sao Paulo’s city and state, southeast Brazil. DNA extraction and HLA A, B, C, DR and DQ typing using Qiagen kits (QIAamp DNA Mini Kit®). The control group was composed by a database of 297 unrelated deceased donors from the city of São Paulo that were typed through the same method. This database is a part of the Transplants State System of the Government’s Health Secretary from the State of Sao Paulo. The statistical significance level was adjusted by using the Bonferroni correction depending on the phenotypic frequencies evaluated to HLA A, HLA B, HLA C, HLA DRB1 e HLA DQB1. **RESULTS:** The alleles HLA-B*57, HLA-C*15, HLA-DRB1*04:02, HLA-DRB1*08:04, HLA-DRB1*14:01, DQA1*03:01, DQB1*03:02 and DQB1*05:03 were associated with susceptibility. Both alleles HLA DRB1*04:02 and HLA-DRB1*14:01 and their respective haplotypes DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 and DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 conferred risk to the disease. **DISCUSSION:** The DRB1*04:02 and DQB1*05:03 alleles are associated with Pemphigus Vulgaris in our study, as

well in various populations. The association in our study with HLA-DRB1*08:04 was confirmed to be specific to this allele and not to linkage disequilibrium to any adjacent gene. The association between HLA-B*57 and pemphigus vulgaris is being reported for the first time at the present study.

CONCLUSIONS: The alleles HLA-B*57, HLA-C*15, HLA-DRB1*04:02, HLA-DRB1*08:04, HLA-DRB1*14:01, DQA1*03:01, DQB1*03:02 and DQB1*05:03 were associated with Pemphigus Vulgaris in Brazilian patients.

Descriptors: pemphigus; HLA antigens; HLA-B antigens; HLA-C antigens; HLA-DR antigens; HLA-DQ antigens; MHC class I genes; MHC class II genes.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O termo pênfigo foi primeiramente usado por Hipócrates (460-370 a.C.) para um quadro que compreendia lesões bolhosas de curta duração na boca e que não corresponde à definição atual da doença. Pênfigo deriva do Grego *pemphix* que significa bolha. Compreende um grupo de doenças bolhosas mucocutâneas autoimunes caracterizadas pela formação de bolhas epiteliais que afetam as superfícies cutâneas e/ou mucosas. Originalmente foi descrita, em 1791, por Wichman ^[1, 2]. Pênfigos podem afetar a pele e a mucosa oral e também podem atingir a mucosa do nariz, conjuntiva, genitais, esôfago, faringe e laringe ^[1, 3].

O pênfigo vulgar (PV) é a forma mais comum dos pênfigos (cerca de 70% dos casos) e frequentemente afeta a cavidade oral ^[4, 5]. Existem relatos na literatura sobre populações de diferentes regiões do mundo que apresentam pênfigo vulgar ^[6], com incidência anual que varia entre 0,08 e 2,72 casos a cada 100.000 habitantes ^[7-11]. Pode se desenvolver em qualquer idade, mas é mais comumente diagnosticado entre a quarta e a sexta década de vida ^[11]. Tipicamente, tem curso crônico, quase invariavelmente causa vesículas, erosões e úlceras na mucosa oral e pele. A morte causada por desidratação e infecções sistêmicas secundárias era comum antes de se consolidar a corticoterapia para o tratamento de pacientes com diagnóstico de PV ^[2, 5, 12, 13].

A perda do contato célula-célula entre os queratinócitos no epitélio (acantólise) leva à manifestação clínica do PV, com bolhas intraepiteliais que após romperem causam lesões de pele e mucosas [1, 14, 15]. Isso ocorre por causa do dano aos desmossomos - estrutura responsável pela aderência das células às estruturas adjacentes, que confere força estrutural à epiderme [14, 16, 17]. A parte central do desmossomo é composta por moléculas de adesão das células epiteliais do grupo das caderinas denominadas desmogleínas que, vistas em microscópio eletrônico, mostram a formação de uma área branca entre as membranas celulares, que atua como uma cola que mantém os desmossomos unidos e, conseqüentemente, as células coesas [14, 17, 18]. No PV, autoanticorpos se ligam às desmogleínas – anti-desmogleína 3 (Dsg3) e/ou anti-desmogleína 1 (Dsg1) – e são críticos na patogênese do PV [19-21].

A teoria de que a doença é herdada por fatores genéticos foi sugerida inicialmente pela susceptibilidade específica ao PV de certos grupos étnicos e populações como os judeus Ashkenazi, pessoas de origem indiana e habitantes do Mediterrâneo, apesar de serem raros os casos familiares reportados [22].

O sistema antígeno leucocitário humano (HLA – do Inglês, *Human Leukocyte Antigen*) consiste de um conjunto de genes, responsável pela codificação de moléculas de histocompatibilidade no ser humano. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC - do Inglês, *Major Histocompatibility Complex*) é um *locus* de susceptibilidade importante para doenças autoimunes como diabetes tipo 1 e artrite reumatoide. A associação de PV

com alelosⁱ HLA foi revelada na década de 80 e comprovada repetidas vezes por análises genéticas e sorológicas. O MHC aparenta ser uma região chave na predisposição genética ao PV [2, 22-24]. Há um consenso de que a doença é multifatorial e de que existe uma forte ligação entre PV e os antígenos leucocitários humanos (HLA) DRB1*0402 e DQB1*0503, porém existe um grande *gap* no conhecimento de como os fatores genéticos e ambientais alteram a expressão dos genes, e promovem o aparecimento da doença, uma vez que a vasta maioria dos indivíduos que carrega estes alelos não a desenvolvem [15].

A função das moléculas HLA é a apresentação de pequenos peptídeos derivados de proteínas do próprio organismo (moléculas de classe I) ou de patógenos (moléculas de classe II) até os linfócitos T, um processo que inicia a resposta imune adaptativa [25]. Diversos estudos realizados em diferentes populações étnicas estão apresentados na Tabela 1 [2].

ⁱ Cada alelo é uma forma alternativa de um mesmo gene.

Tabela 1 – Genes do complexo principal de histocompatibilidade identificados em associação com pênfigo vulgar em diferentes populações.

População	Quantidade de indivíduos		Alelos	Ref.
	Pacientes	Controles		
Argentinos	47	199	DRB1*0402; DRB1*1401; DR8; DQB1*0503; DQB1*0302	[26]
Brasileiros	36	162	DRB1*0402; DRB1*08:04; DRB1*14	[2]
Canadenses	52	610	A26, B38, Cw12, DRB1*01, DRB1*0402, DRB1*1401, DRB1*1404, DQB1*0302, DQB1*0503	[50]
Eslovacos	43	113	DRB1*04:02; DRB1*04:04; DRB1*14:54; DRB1*14:04; DRB1*14:05; DQB1*03:02; DQB1*05:03	[49]
Espanhóis	26	200	DRB1*0402, 1401; DQB1*0503, 0302	[27]
Franceses	37	106	DRB1*0402, 1401, 1404; DQB1*0302; 0503	[28]
Indianos	37	89	DRB1*1404; DRB1*0202; DQA1*0101; DQB1*0503	[29]
Iranianos	38	57	DRB1*0402	[30]
Italianos	61	128	DRB1*0402, DRB1*1401; DQB1*0503	[31, 32]
Japoneses	86	642	DRB1*0403, 0406; DRB1*1401, 1405, 1406; DQB1*0503; B15; A26	[33-37]
Judeus Ashkenazi	26	-	DR4, DQw8	[38]
Mexicanos	25	96	DR14(DR6)	[39]
Norte-americanos	38	44	DR4 Dw10 (DR6 like);	[40-42]
	58	1899	DRB1*0402; DQB1*0503	[43]
Oriente Médio	54	85	DQB1*0302, DQB1*0305	[48]
Paquistaneses	19	-	DRB1*1404; DQA1*0101; DQB1*0503	[44]
Sardenhos ^a	16	-	DRB1*0402; DQA1*0301; DQB1*0302	[45]
Sírios	91	270	DRB1*0402; DRB1*14	[22]
Turcos	33	100	B35; B44; Cw4; DR4; DR14; DQ4; DQ8; DQ7; DQ2; DR11	[46]
	60	60	DRB1*04; DRB1*14; DQB1*05; DPB1*0401	[11]
Venezuelanos	49	101	DRB1*0402; DRB1*1401	[47]

Fonte: Weber et al. (2012); Ref. = referência; ^a As diferenças genéticas entre as populações da Sardenha (Itália) e Itália continental são muito distintas como afirma Caló et al. (2008)ⁱⁱ. Existe um isolamento genético deste grupo em comparação com o da Itália continental e o restante dos países europeus e o Mediterrâneo.

ⁱⁱ Caló CM, Melis A, Vona G, Piras IS. Sardinian population (Italy): a genetic review. *Int J Mod Anthropol*. 2008;1:39-64.

As moléculas de HLA de classe I (A, B e C) não têm sido alvo de atenção nos diversos estudos realizados até o momento, mas a vasta maioria aponta a correlação entre DRB1, DQA1 e DQB1 [2, 11, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 50, 51].

A metanálise realizada em 2012 [52] com 18 estudos acerca dos polimorfismos de HLA, com o intuito de investigar a correlação entre DRB1 e PV, mostrou que os alelos DRB1*04, DRB1*08 e DRB1*14 aumentaram significativamente a susceptibilidade ao PV, enquanto os DRB1*03, DRB1*07 e DRB1*15 diminuíram essa susceptibilidade.

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de miscigenações entre populações de três continentes diferentes: europeus, africanos e ameríndios autóctones. A cor da pele ao exame físico não pode predizer a ancestralidade genômica [2, 53].

Não havia estudos na população brasileira referentes a genes que conferem susceptibilidade ao pênfigo vulgar até 2011, quando foi realizada a primeira análise em uma população do sudeste brasileiro [2]. Nesse estudo, feito por Weber et al. [2], não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre PV e alelos dos *loci* A ou B. Para o *locus* DR, no entanto, os alelos DRB1*04, DRB1*08 e DRB1*14 apresentaram associação estatisticamente significativa, com risco relativo (RR) de 5,5 (IC_{95%}: 2,8 – 11,0) ($p = 0,000001$); 4,7 (IC_{95%}: 2,3 – 9,5) ($p = 0,000066$); e, 4,8 (IC_{95%}: 2,2 – 10,4) ($p = 0,000389$), respectivamente como mostra a Tabela 2. Os *locus* C, DQA1 e DQB1 não foram avaliados.

Tabela 2 – Prevalência dos alelos HLA *locus* DR em indivíduos do sudeste brasileiro.

HLA	Grupo		p	RR (IC _{95%})
	PV (n = 36) n (%)	Controle (n = 712) n (%)		
DRB1*01	3 (8,3 %)	144 (20,2 %)	0,087	0,4 (0,1 – 1,2)
DRB1*03	4 (11,1 %)	134 (18,8 %)	0,37	0,5 (0,2 – 1,6)
DRB1*04	21 (58,3 %)	144 (20,2 %)	< 0,001 ⁽¹⁾	5,5 (2,8 – 11,0)
DRB1*07	5 (13,9 %)	150 (21,1 %)	0,4	0,6 (0,2 – 1,6)
DRB1*08	14 (38,9 %)	85 (11,9 %)	< 0,001 ⁽¹⁾	4,7 (2,3 – 9,5)
DRB1*09	1 (2,8 %)	28 (3,9 %)	1,0	0,7 (0,1 – 5,3)
DRB1*10	2 (5,6 %)	26 (3,7 %)	0,64	1,6 (0,4 – 6,8)
DRB1*11	6 (16,7 %)	176 (24,7 %)	0,32	0,6 (0,2 – 1,5)
DRB1*12	1 (2,8 %)	23 (3,2 %)	1,0	0,9 (0,1 – 6,5)
DRB1*13	2 (5,6 %)	188 (26,4 %)	0,003	0,2 (0,04 – 0,7)
DRB1*14	10 (27,8 %)	53 (7,4 %)	< 0,001 ⁽¹⁾	4,8 (2,2 – 10,4)
DRB1*15	1 (2,8 %)	133 (18,7 %)	0,012	0,1 (0,02 – 9,2)
DRB1*16	1 (2,8 %)	48 (6,7 %)	0,5	0,5 (0,1 – 3,0)

Fonte: Weber et al. (2012)

HLA = antígeno leucocitário humano; n = quantidade de indivíduos; PV = Pênfigo Vulgar; RR = Risco Relativo; IC = Intervalo de confiança; ⁽¹⁾ = Diferença estatisticamente significativa após correção para múltiplos testes pelo método FDR ($p < 0,00113173$).

A associação positiva do DRB1*04:02 e DRB1*14 com o pênfigo vulgar já foi relatada diversas vezes em todo o mundo [26-28, 31, 32, 47]. Por outro lado, em poucos estudos foi observado o aumento da prevalência do alelo DR8 em pacientes com PV, quando comparados com os pacientes controle [2].

Sabe-se que existe um desequilíbrio de ligação acentuado (Anexo A) entre alguns alelos DR e DQ e em determinadas pesquisas foi mostrado que a susceptibilidade ao pênfigo vulgar, observada nos indivíduos portadores de HLA-DRB1*14, é secundária ao DQB1*05:03 [2, 48].

A possibilidade de alelos do sistema HLA conferirem risco ou proteção para determinadas doenças revela a importância da genotipagem constante de pacientes com PV [43]. A informação genética pode elucidar as vias envolvidas na doença e permitir identificar novos alvos para intervenções terapêuticas, avanços que são de interesse na pesquisa básica e aplicada. O esclarecimento genético pode levar a avanços no diagnóstico ou capacidade de uso de agentes terapêuticos mais eficientes e com riscos menores de efeitos adversos [43].

Esclarecer quais moléculas realmente conferem risco de o indivíduo apresentar PV é fundamental na definição dos requisitos necessários para o complexo HLA-autoantígeno-receptor de linfócitos T, que resultam em reação autoimune viável. Certos alelos que foram associados à doença, com fundamento apenas na análise de frequência, podem não ser realmente relevantes (ou seja, não desempenham papel na patogênese da doença), mas sim serem mais prevalentes na doença por existir desequilíbrio de ligação com genes realmente promotores de susceptibilidade [43].

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é tipificar os alelos do sistema HLA A, B, C, DRB1, DQA1 e DQB1 em pacientes portadores de PV, procedentes do estado de São Paulo, e identificar aqueles que conferem susceptibilidade à doença, mediante a comparação da prevalência destes alelos com um grupo controle livre da doença.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biologia do epitélio e os desmossomos

Os desmossomos são a parte mais importante da coesão intercelular na zona de aderência entre os queratinócitos, porque promovem a força estrutural da epiderme. A integridade dos queratinócitos é essencial no intuito de preservar as funções e a estrutura tecidual do epitélio. Enquanto a aderência entre os queratinócitos acontece por meio de desmossomos, na membrana basal ela ocorre graças aos hemidesmossomos [2, 54]. Os desmossomos são mais numerosos em tecidos sujeitos a estresse mecânico significativo como o epitélio estratificado escamoso da pele, as mucosas e o miocárdio [55].

A primeira descrição da ultraestrutura dos desmossomos foi feita, em 1958, por Odland ⁱⁱⁱ. Os desmossomos são junções discoides com diâmetro de 0,2-0,5 μ m e são compostos por duas placas com densidade alta de elétrons, separadas por uma fenda de extensão reduzida. Dentro destas placas existem proteínas de adesão, com propriedade de união direta e de superfície, para ancoragem dos filamentos intermediários de queratina do citoesqueleto, proporcionando, assim, resistência mecânica ao tecido. A família de proteínas, denominada caderinas - desmogleinas e desmocollinas -

ⁱⁱⁱ Odland GF. The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. J. Biophys Biochem Cytol. 1958;25(4):529-38.

3.2 Pênfigo vulgar

3.2.1 Epidemiologia

A média anual de incidência de PV a cada 100.000 habitantes é de: 0,08 na Finlândia [57]; 0,17 na França [23]; 0,2 na Arábia Saudita [8]; 0,25 na Sicília, Itália [58] e região mediterrânea da Turquia [59]; 0,44 na Macedônia [60]; 0,47 na Bulgária [7]; 0,68 no Reino Unido [61]; 0,8 na Grécia [62]; 1,6 em Israel [10]; e, 32 casos novos para cada 100.000 habitantes judeus adultos em Hartford County, U.S.A. [23].

A manifestação inicial de PV costuma se apresentar, embora não exclusivamente, entre a quarta e a sexta década de vida, e é mais rara em neonatos e crianças [63, 64]. Desta maneira, como para a maioria das doenças autoimunes, os estudos têm demonstrando uma prevalência maior em pacientes do gênero feminino [2, 5, 7, 59-61, 65].

3.2.2 Aspectos clínicos

Com características que o difere de outros tipos de pênfigos, o PV afeta a pele e a mucosa oral. Pode, também, atingir as mucosas do nariz, conjuntiva, vulva, esôfago, faringe e laringe [1, 66]. Diferencia-se dos outros pênfigos por aspectos clínicos e histológicos conforme ilustra a Figura 2.

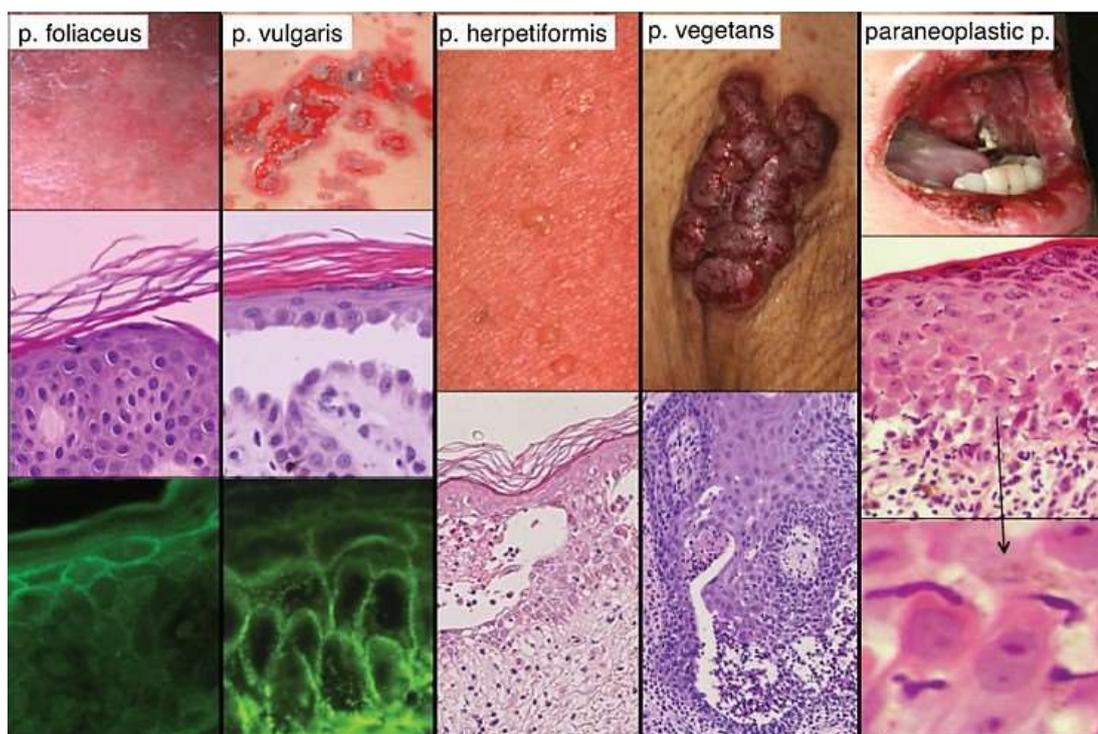


Figura 2. Diversidade de fenótipos de pênfigo: P. foliáceo e P. vulgaris não são inflamatórios, enquanto o herpetiforme, vegetante e paraneoplásico são inflamatórios. Microscopia com imunofluorescência de P. foliáceo e P. vulgaris mostraram depósito de IgG na superfície do queratinócito na camada superior e inferior, respectivamente. (Fonte: Kitajima, 2014 ^[14])

As lesões orais são comuns em pacientes com PV (90% dos casos) e, ao exame clínico, costumam apresentar lesões erosivas de formato irregular, dolorosas e de cicatrização lenta na mucosa jugal, lábios e palato ^[62], isoladamente ou em conjunto de dois ou três locais diferentes. Na cavidade oral, raramente são visualizadas lesões vesico-bolhosas por causa do rompimento precoce, consequência do trauma constante da região ocasionado pela fala e deglutição ^[1, 5, 10, 67], (Figura 3).



Figura 3. Manifestações clínicas: Lesão em mucosa jugal. (Fonte: Black, Mignogna e Scully, 2005 ^[54])

A gengivite descamativa ou erosiva é uma lesão comumente encontrada nas gengivas e inicia-se com surgimento de bolhas e/ou erosões que evoluem até formar o quadro de epitélio esfoliado e úlceras profundas, especialmente na gengiva fixa ^[5, 68] (Figura 4). Caso não seja instituído tratamento precoce adequado, mesmo em exacerbações do quadro clínico, são verificadas lesões faríngeas e laríngeas com aspecto doloroso, que podem resultar em disfagia e dificuldade grave de alimentação ^[66] (Figura 5).



Figura 4. Gengivite descamativa.



Figura 5. Manifestações clínicas do pênfigo vulgar: cavidade oral – lesão avançada.

As lesões na epiderme surgem na forma de bolhas, seja em pele normal ou eritematosa, e em qualquer região do corpo. A flacidez das bolhas, leva a seu rompimento precoce e gera lesões erosivas, com crostas

hemáticas [2, 63]. O sinal de Nikolsky foi primeiramente descrito pelo dermatologista russo Piotr Vasiliyevich Nikolsky, no final do século 19, como citam Mignoma et al. (2008) [69]. Quando o sinal é positivo, células epiteliais são separadas umas das outras da membrana basal em virtude da fragilidade dos ligamentos epiteliais. Ao pressionar uma pele aparentemente normal próxima à lesão do pênfigo é induzido o descolamento epidérmico, indicando deste modo que o teste é positivo e que a doença está em atividade (Figura 6) [69].

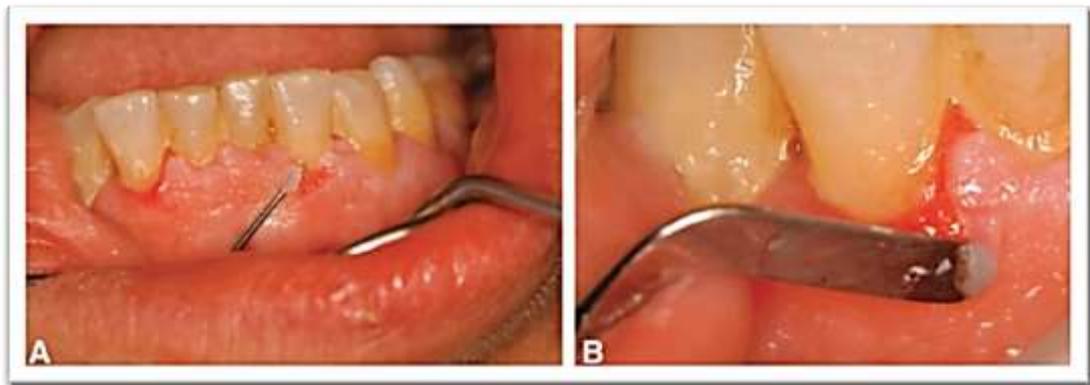


Figura 6. Sinal de Nikolsky em paciente com diagnóstico de pênfigo vulgar. (Fonte: Mignoma et al., 2008^[69]).

3.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico de PV depende de exames histopatológicos e imunológicos realizados por biópsia. O paciente com quadro sugestivo de lesões erosivas vesico-bolhosas ou ulcerativas, que afetam a mucosa oral e com suspeita clínica de PV deve ser encaminhado para o procedimento, que pode ser realizado sob anestesia local mediante biópsia perilesional [1]. O

exame anatomopatológico em caso de tecido com PV, evidencia bolha intraepidérmica supra basal (Figura 7A), e a imunofluorescência direta (IFD) depósitos de IgG e complemento na superfície dos queratinócitos da epiderme (Figura 7B).

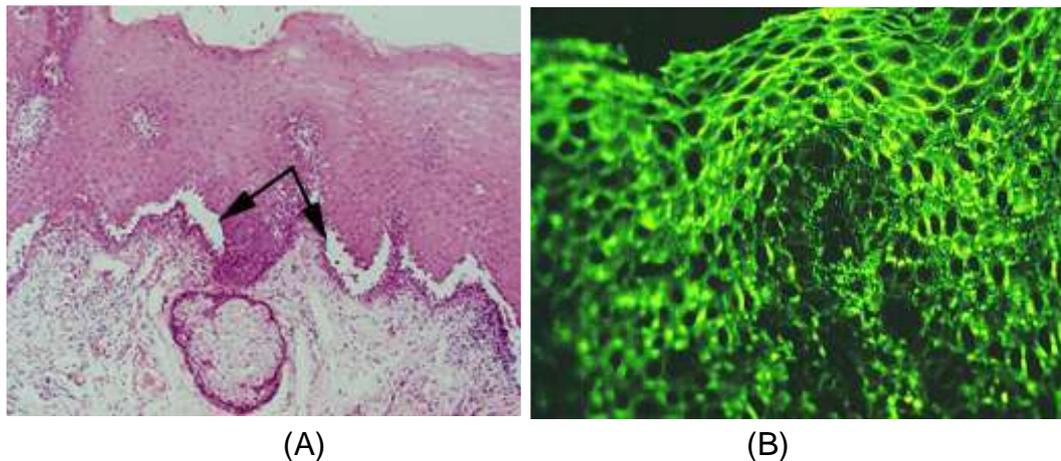


Figura 7. Peculiaridades para o diagnóstico de pênfigo vulgar. (A) Exame anatomopatológico que evidencia bolha intraepidérmica com nível de clivagem supra basal (setas). (B) imunofluorescência direta que mostra depósitos de IgG e C3 na superfície dos queratinócitos da epiderme.

Para auxiliar no prognóstico e conduzir o tratamento do paciente com PV, pode-se utilizar o sangue periférico do mesmo para aplicar a imunofluorescência indireta (IFI). Na IFI, os autoanticorpos IgG circulantes são detectados ao usar como substrato a pele de prepúcio humano, esôfago de macacos ou bexiga de macacos ou roedores ^[70]. Neste caso, o método ELISA permite pesquisar anticorpos IgG anti-desmogleínas 1 e 3 que reagem com as Dsg 1 e 3 recombinantes. Pacientes com lesões mucosas predominantes apresentam apenas anti-Dsg3, enquanto os que possuem o quadro mucocutâneo apresentam anti-Dsg1 e anti-Dsg3 ^[17].

3.2.4 Fisiopatologia

3.2.4.1 Autoanticorpos antidesmossomos

O PV é uma doença bolhosa autoimune causada, primordialmente, por anticorpos, anti-desmogleína 3 ^[17]. A ligação desses anticorpos com a Dsg3 causa a sua depleção dos desmossomos, a perda do contato entre as células (acantólise) e consequente vesiculação intraepitelial ^[18], Figura 7A. Pulkkinen et al. ^[71] comprovaram que a deleção do gene da Dsg3 em ratos pode determinar a perda da adesão celular epitelial. A participação direta de autoanticorpos contra Dsg na patogênese do PV foi confirmada por muitos estudos, por exemplo a exposição do soro de pacientes com lesão causada pelo pênfigo com as Dsg recombinantes, que resulta em uma perda de patogenicidade desse soro ^[72].

Anticorpos patogênicos contra Dsg3, uma glicoproteína de aproximadamente 130kDa, afetam apenas as camadas inferiores (supra basais) da epiderme. Em casos de pacientes com PV com anti-Dsg1 e anti-Dsg3, o quadro clínico apresentado é o de PV mucocutâneo, uma vez que os anticorpos anti-Dsg1 são expressos, mormente, nas camadas superiores da epiderme ^[14].

3.2.4.2 Imunidade celular

Linfócitos T específicos a Dsg3 são detectados em sangue periférico de pacientes com PV e portadores assintomáticos dos alelos DRB1*04:02 e DQB1*05:03, o que leva a concluir que a presença de linfócitos T anti-Dsg3

não é suficiente para desencadear PV [73]. A ativação de linfócitos B para produção de autoanticorpos requer a ajuda de linfócitos T CD4⁺ (LTCD4). Entretanto, a deflagração do processo autoimune ainda é incerta [1]. A associação intensa entre PV e diferentes alelos do sistema HLA – que é elucidada mais adiante – sugere o envolvimento de LTCD4 na gênese do PV. O reconhecimento de epítos^{iv} de Dsg pode ser crucial para a iniciação e perpetuação da produção de autoanticorpos específicos pelos linfócitos B [74]. No estudo de Nishifuji et al. [75], os linfócitos B secretores de IgG específica para Dsg3 foram detectados em estimulação *in vitro* de linfócitos periféricos de pacientes com PV. A depleção de LTCD4⁺ levou à inativação das células B autorreativas. A produção de IgG por estas células também foi abolida quando anticorpos monoclonais anti-HLA-DR ou anti-HLA-DQ foram adicionados às culturas. Tais achados sugerem, enfaticamente, que as células B Dsg3 específicas circulantes são reguladas por LTCD4⁺ controladas por HLA classe II [76].

Imunossuppressores como corticosteroides, ciclofosfamida, azatioprina e metotrexate têm sido usados no tratamento de PV, porém apresentam efeitos colaterais significativos.

Rituximab, um anticorpo monoclonal, tem a função de depletar pré Células B e Linfócitos B maduros com resultados impressionantes de remissão do quadro clínico de PV, que pode variar de 86% a 100% [73, 77].

^{iv} Epítopo: menor parte de um antígeno capaz de estimular resposta imunológica.

Trata-se de um anticorpo anti-CD20. Como o CD20 é encontrado em todas as Células B maduras, em teoria, deveria eliminar as células B anti-Dsg.

3.2.5 Evidências de participação genética na susceptibilidade ao pêfigo vulgar

Existe um histórico genético muito eloquente associado à PV. Alguns grupos étnicos como os judeus Ashkenazi, aqueles originários do Mediterrâneo e Sul Asiático, são especialmente vulneráveis. Relatos de casos de PV na mesma família são raros, como os que envolvem irmãos, pais e familiares [78]. Duas observações endossam a hipótese da participação genética na susceptibilidade ao PV. A primeira é o aumento da prevalência de doenças autoimunes em parentes de primeiro grau de pacientes com PV, quando comparados aos controles saudáveis. A segunda é a detecção de anticorpos anti-Dsg3, um fenótipo parcial do processo imune, que foi frequentemente (>50%) detectado em parentes assintomáticos permitindo definir um padrão de herança dominante [2, 23].

Existem diversas abordagens para identificar genes que participam da susceptibilidade de uma doença autoimune. A estratégia mais comum costuma ter como objetivo testar genes que codifiquem uma molécula que se supõe tenha um papel na desregulação imune que leva ao processo autoimune. Estudos populacionais, em particular os estudos caso-controle, permitem testar a associação entre um determinado risco e a doença, e se baseiam em indivíduos afetados e não afetados [2, 23].

3.3 O complexo principal de histocompatibilidade e o sistema de antígeno leucocitário humano

O complexo principal de histocompatibilidade tem esta denominação porque no momento em que foi descoberto, referia-se aos genes principais associados com a rejeição de tecidos. Trata-se do conjunto de genes que codificam as moléculas de histocompatibilidade ^[79]. O MHC está situado no braço curto do cromossomo 6 e os genes reunidos nesse local podem ser divididos em três grupos de acordo com o tipo de moléculas que codificam – classe I, II e III. Os genes de classe I codificam as moléculas de HLA-A, B e C, enquanto os de classe II as HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP. Os genes de classe III não produzem moléculas de histocompatibilidade e não estão relacionados com a resposta imune ^[25]. Os genes HLA das classes I e II possuem estrutura e funcionalidades distintas (Figura 8) ^[2].

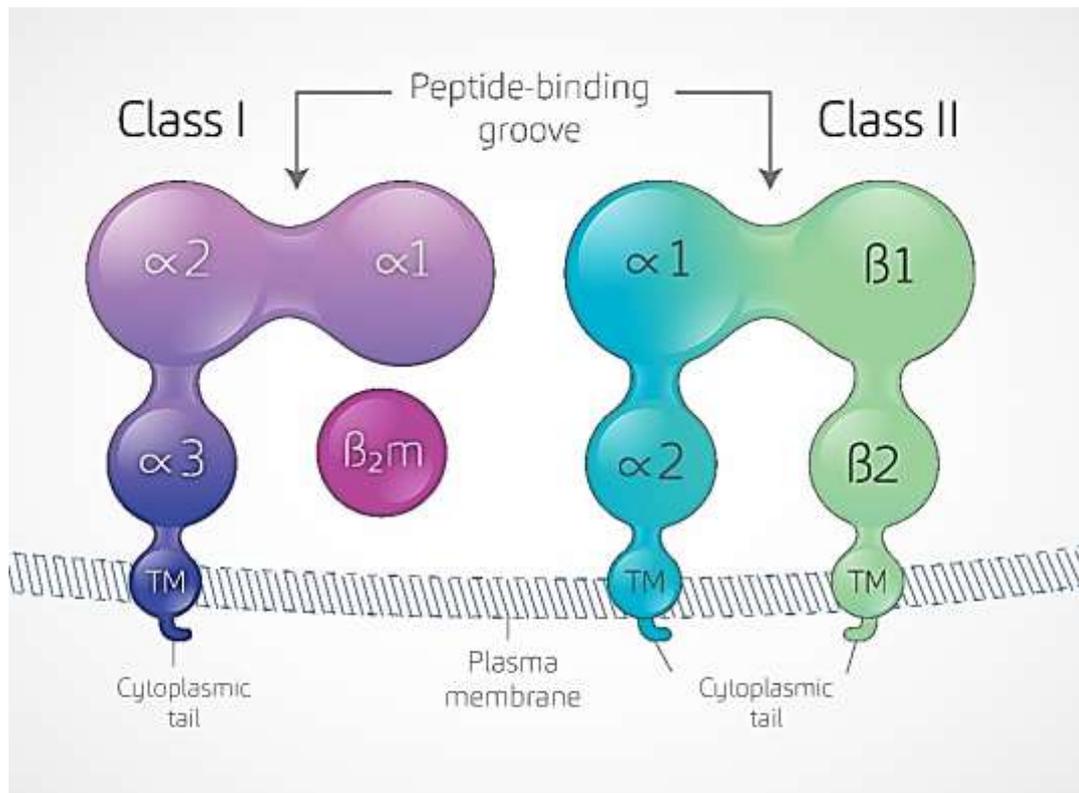


Figura 8. Estrutura das moléculas de HLA classe I e classe II. β -2-microglobulina é a cadeia leve da molécula de classe I. A cadeia α da molécula de classe I tem dois domínios de ligação a peptídeos: $\alpha 1$ e $\alpha 2$, um domínio semelhante à imunoglobulina $\alpha 3$, a região transmembrana (TM), e a cauda citoplasmática (*cytoplasmic tail*). Cada uma das cadeias, α e β , de classe II tem quatro domínios: o sítio de ligação a peptídeos (*peptide-binding domain*) ($\alpha 1$ ou $\beta 1$), o domínio semelhante à imunoglobulina ($\alpha 2$ ou $\beta 2$), a região transmembrana (TM) e a cauda citoplasmática (*cytoplasmic tail*). *Plasma membrane* = membrana citoplasmática. (Fonte: modificado de Klein e Sato, 2000^[25])

Genes de classe I codificam receptores que estão presentes na superfície da maioria das células nucleadas e, primariamente, teriam a função de facilitar a resposta imune aos patógenos intracelulares, enquanto os de classe II são encontrados somente em um subgrupo de células associadas com a resposta imune aos patógenos extracelulares, que são os linfócitos B, linfócitos T, macrófagos e células dendríticas ^[25]. As moléculas de classe II são heterodímeros formados por uma cadeia α e β , produzidos no

cromossomo 6 e contém dois domínios $\alpha 1/\alpha 2$ e $\beta 1/\beta 2$. Com relação à nomenclatura, são nomeadas: a classe (D), a família (M, O, P, Q, ou R) e a cadeia (A ou B), seguindo, por exemplo, o modelo HLA-DQB1*05:03 que denomina o alelo 05:03, que codifica a cadeia β de uma molécula classe II pertencente à família Q [2].

O nível elevado de polimorfismo característico dos genes MHC classe I e II é consequência da região ligadora de peptídeos (PBR - do inglês, *Peptide-Binding Region*), que possui grande diversidade de alelos. Os genes dessa região codificam as proteínas que são apresentadas às células T e ativam a resposta imune. Cada alelo responde, tipicamente, a uma categoria de antígenos potenciais, portanto, um indivíduo ou uma população com uma diversidade mais elevada de MHC deve responder melhor com a variedade de infecções.

3.4 Importância da identificação dos alelos associados ao PV para elucidação de sua fisiopatologia

Na fisiopatologia, a associação dos alelos é muito importante, uma vez que os mesmos parecem ser críticos para o reconhecimento da Dsg3 pelos linfócitos T. A informação genética pode auxiliar no estudo das vias envolvidas na doença, melhorar a diagnose e identificar alvos novos para intervenções terapêuticas [80].

Certos alelos podem estar presentes em pacientes portadores de PV, porém não desempenham um papel na doença, por causa de um fenômeno denominado desequilíbrio de ligação ^[43] (Anexo A).

3.5 Base estrutural para susceptibilidade ao pênfigo vulgar de portadores do alelo HLA DRB1*0402 e HLA DQB1*05:03

Dois polimorfismos de genes de HLA associados ao PV, DRB1*04:02 e DQB1*05:03, possuem avides de ligação com a Dsg3, mas em localizações diferentes. O DRB1*04:02 se liga aos peptídeos derivados do domínio extracelular de Dsg3, enquanto o DQB1*05:03 se liga ao terminal COOH-, o que sugere múltiplas interações dos peptídeos de Dsg3 aos alelos de classe II de HLA. Uma quantidade limitada de peptídeos de Dsg3 com carga positiva na posição 4 foi identificada com a propriedade de se ligar à DRB1*04:02 que contém resíduos de aspartato e glutamato nas posições DRB70 e DRB71, respectivamente. Pelo fato do HLA-DQB1*05:03 também possuir carga positiva na posição 71, isso pode permitir ligação similar aos peptídeos de Dsg3. Células T autorreativas de pacientes com HLA-DQB1*05:03 e PV reconhecem epitopos de Dsg3 que também são reconhecidos por células T de pacientes com PV e HLA-DRB1*04:02 ^[73].

Com esta base estrutural, é possível associar os alelos de HLA DRB1*04:02 e DQB1*05:03 com a autoimunidade em pacientes com PV, porque, uma vez iniciada a apresentação da Dsg como um autoantígeno, é

iniciada a ativação de linfócitos T e depois de linfócitos B que iniciam a proliferação de anticorpos anti-Dsg [2].

3.6 Associação entre outros alelos do sistema HLA e o pênfigo vulgar

Dez alelos DRB1 estão associados ao PV de acordo com estudos populacionais transversais do tipo caso-controle (DRB1*0402, *0403, *0406, *0802, *0804, *1401, *1404, *1405, *1408, *1454) e seis alelos DQ (DQB1*0302, DQB1*0503, DQA1*0101, DQA1*0301, DQw8, DQ8) em 18 populações diferentes [2, 11, 26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37-50].

3.7 Particularidades da formação da população brasileira

Após cinco séculos de miscigenação entre as populações de três continentes: europeus, africanos e ameríndios autóctones, a população brasileira se tornou uma das mais heterogêneas do mundo. Quando o Brasil foi descoberto, havia aproximadamente 2,5 milhões de índios que viviam na região [81]. A miscigenação inicial ocorreu entre o colonizador e o colonizado e, a partir de 1550, cerca de 3,5 milhões de africanos foram trazidos ao Brasil como escravos [82]. Próximo a 500.000 portugueses desembarcaram no Brasil até 1808 e, daí em diante, 4 milhões de imigrantes de diversas partes do mundo imigraram também [81].

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) ^[83], cada indivíduo é classificado como pertencente a uma das cinco raças seguintes: branca, preta, amarela (oriental), parda (mulata, cabocla, cafuza, mameluca ou mestiça de preto com outra cor ou raça) ou indígena.

Em estudo publicado por Parra et al. (2003)^v, para avaliar a correlação entre a cor da pele (ou raça) e ancestralidade em 173 indivíduos brasileiros de uma população rural do sudoeste brasileiro, e depois refeito com 200 indivíduos não relacionados de uma região urbana, os autores verificaram que, em nível individual, a cor avaliada ao exame físico é um marcador pobre para indicar a ancestralidade europeia ou africana. Pimenta et al. (2003) chegaram à essa mesma conclusão ^[53].

No presente estudo não foi efetuada a estratificação estatística por raça, porque, para o grupo controle, não havia dados disponíveis neste aspecto. Mesmo que os mesmos fossem acessíveis, por causa da miscigenação de diversas raças no Brasil, isto não teria significado para a análise aqui efetuada.

^v Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(1):177-82.

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, HC–FMUSP, tendo como responsável o Prof. Dr. Ivan Dieb Miziara, registro *on-line* 8961 (Apêndice 1). Foi aprovado, também, pela Plataforma Brasil (Apêndice 2). O material necessário para a sua realização foi inteiramente financiado pela FAPESP (Apêndice 3).

O desenho do estudo é observacional transversal do tipo caso-controle.

4.1 Casuística

4.1.1 Pacientes

4.1.1.1 Critérios de inclusão

Os pacientes elegíveis incluídos no presente estudo foram oriundos dos ambulatórios de Estomatologia da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica e de Doenças Bolhosas da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Todos os pacientes foram convidados a participar do estudo, e somente o fizeram após o preenchimento e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 4). No caso de pacientes com idade inferior a

18 anos, a participação foi condicionada à aprovação dos pais ou responsáveis legais.

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

1) Diagnóstico de Pênfigo Vulgar prévio mediante o preenchimento de todos os critérios seguintes:

- a) achados clínicos: história de doença bolhosa que tivesse acometido mucosas e/ou pele;
- b) histopatologia: biópsia de pele ou mucosa que evidenciasse acantólise e clivagem supra basal (Figura 7A);
- c) imunopatologia: imunofluorescência, direta ou indireta, que mostrasse anticorpos IgG que se ligavam aos espaços intercelulares da epiderme (Figura 7B).

4.1.1.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão considerados foram:

- a) Pacientes que apresentassem evidências de Pênfigo Paraneoplástico (secundário às neoplasias), de acordo com os critérios revisados por Camisa e Helm^[84];
- b) Pacientes com diagnóstico de PV cujo familiar consanguíneo, com o mesmo diagnóstico, já tivesse participando do estudo.

O grupo de casos foi composto por 51 pacientes, dentre eles 37 pacientes eram do gênero feminino e 14 do gênero masculino. Dentre os 51

pacientes, 31 já haviam sido selecionados para estudo realizado por Weber et al.^[2], o consentimento informado havia sido preenchido e o DNA extraído. Desta forma, 20 casos novos foram adicionados a esta casuística, totalizando os 51 pacientes.

4.1.2 Controles

Os dados do grupo controle foram obtidos a partir de um banco de dados de 297 doadores falecidos na cidade de São Paulo entre 01/01/2011 e 22/03/2012. Este banco faz parte do Sistema Estadual de Transplantes da Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo e possui a idade do paciente na época da coleta. Todos tiveram suas amostras de DNA tipificadas no Laboratório de Imunologia de Transplantes do Instituto do Coração (InCor) da FMUSP.

4.2 Método

4.2.1 Avaliação clínica e coleta de amostra de sangue periférico

Para cada paciente foram coletados dados referentes ao gênero, idade e cor da pele. A seguir, foi realizada anamnese quanto à presença de sinais e sintomas de pênfigo vulgar, além da revisão de prontuário quanto à existência de lesões (ativas ou pregressas) nas mucosas oral, nasal, faríngea e laríngea ao exame de nasofibrolaringoscopia. Os dados foram registrados conforme

protocolo de avaliação de sinais e sintomas clínicos (Anexo B) [2]. A classificação da cor da pele (ou raça) utilizada foi a mesma aplicada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [83], na qual a própria pessoa se classifica em uma das cinco categorias: branca, preta, amarela (oriental), parda (mulata, cabocla, cafuza, mameluca ou mestiça de preto com outra cor ou raça) ou indígena.

Após a anamnese, foi colhida uma amostra de 10mL de sangue periférico de cada paciente em tubo que continha solução de 25mM de EDTA. As amostras, conservadas em temperatura ambiente, seguiram para o laboratório de análises em até 12 horas após a coleta.

4.2.2 Extração e tipificação de DNA

A extração de DNA e a tipificação HLA de classes I e II de resolução alta foram realizadas no Laboratório de Imunologia de Transplantes do InCor para todos os pacientes.

4.2.2.1 Extração de DNA de sangue periférico

A extração de DNA da amostra de sangue periférico dos pacientes foi realizada com auxílio do *kit* marca QIAGEN (*QIAamp DNA Mini Kit*[®], U.S.A.) mediante os passos seguintes:

- Em um tubo com capacidade de 1,5mL foram adicionados 20µL de proteinase K e 200µL de *buffer coat* de sangue fresco ou congelado. Em seguida, o tubo foi colocado em banho-maria a 56°C por 3h, e posteriormente,

no vórtex por 5s e, a seguir, incubado por 10min para promover a quebra das proteínas.

- Após o procedimento anterior, ao lisado foram adicionados 200 μ L de etanol a 96%-100% e misturados para posterior pipetagem e centrifugação por 1min. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de *Buffer AW1* (Figura 9) e a mistura centrifugada novamente durante 1min à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 500 μ L de *Buffer AW2* (Figura 9) e a solução resultante centrifugada, em temperatura ambiente, a 14.000rpm durante 4min. À solução centrifugada foram adicionados 200 μ L de água destilada e esta mistura foi incubada, à temperatura ambiente, por 5min. Depois, centrifugada a 8.000 rpm durante 1min à temperatura ambiente. Finalmente, o DNA purificado e homogeneizado foi mantido a 4^oC para posterior tipificação.



Figura 9. *Buffers* utilizados no laboratório de Imunologia do InCor para extração de DNA.

Na mesma semana em que foram realizadas as análises, a concentração de DNA foi medida em espectrofotômetro NanoDrop™ (ND-1000 UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, DE, U.S.A.) em comprimento de onda entre 260nm e 280nm (região UV). O valor da razão para as absorbâncias 260nm e 280nm (A_{260nm}/A_{280nm}) deveria ser $\geq 1,8$ e $\leq 2,0$. Abaixo de 1,8 indicaria contaminação com proteínas e acima de 2,00 contaminação com ácido ribonucleico (RNA). Produtos da extração do DNA fora do intervalo $[\geq 1,8; \leq 2,00]$ eram descartadas e colhida nova amostra de sangue [2].

4.2.2.2 Tipificação HLA pelo método PCR-SSO

A tipificação do HLA nos *loci* A, B, C, DR e DQ foi realizada após a extração do DNA utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR - do Inglês *Polymerase Chain Reaction*) e amplificação com oligonucleotídeos sequência-específica (SSO - do Inglês *Sequence-Specific Oligonucleotide*) [85, 86] por meio de *kits* LABType® (One Lambda, INC – Canoga Park, CA, U.S.A.). No método LABType® SSO são utilizadas sondas ligadas a microesferas codificadas por método fluorescente, para identificar alelos correspondentes na amostra de DNA. O LABType® permite aplicar a tecnologia Luminex® para o método de tipificação de DNA SSO reverso. Inicialmente, o DNA alvo é amplificado via PCR utilizando um iniciador (*primer*) de grupo específico. O produto da reação é marcado com biotina, que permite detectá-lo ao utilizar Streptavidina conjugada à Ficoeritrina-R. O produto desta reação é, então, desnaturado, para a hibridização das sondas de DNA complementar conjugadas às microesferas codificadas anteriormente. Um analisador de

fluxo (Figura 10), LABScan™ 100 (One Lambda, INC. – Canoga Park, CA, U.S.A.), identifica a intensidade de fluorescência da ficoeritrina (Figura 11) de cada microesfera. A indicação da tipagem do HLA é baseada no padrão do resultado da reação encontrado, comparado com auxílio do programa *HLA fusion™ Analysis Software for Windows* (Figura 12) a padrões associados às sequências de genes HLA publicados na literatura [87], atualizados semanalmente e disponíveis *online* [2, 88].



Figura 10. Analisador de fluxo - LABScan™ 100.

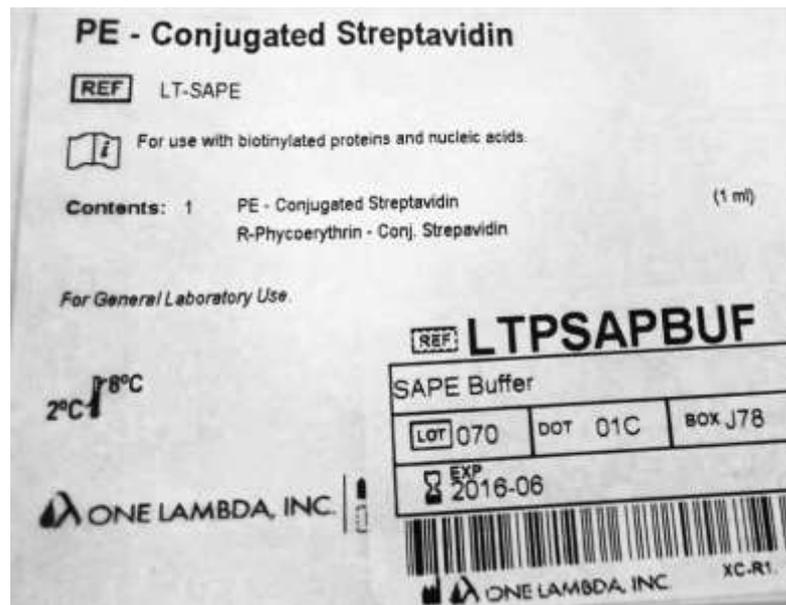


Figura 11. Streptavidina conjugada à Ficoeritrina-R (One Lambda, INC.) usada para a realização das análises.

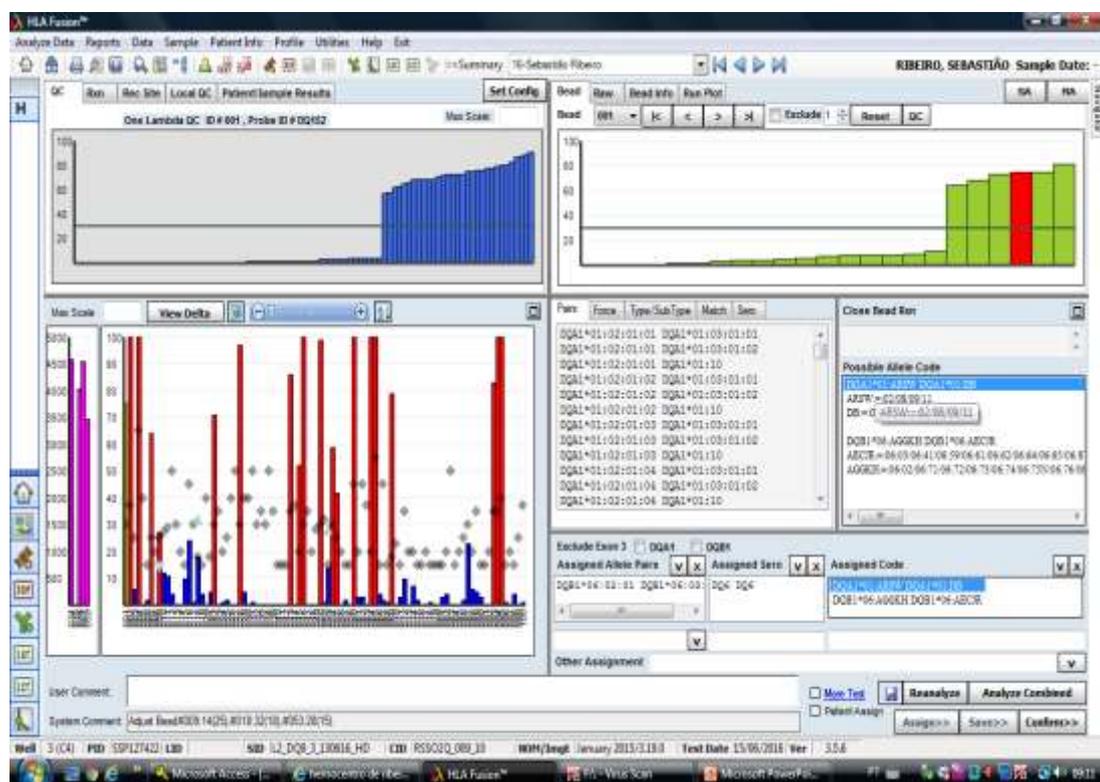


Figura 12. Tela de aquisição do HLA fusion™ Analysis Software for Windows

4.3 Análise Estatística

Todas as variáveis do presente estudo são qualitativas. Foram calculadas as frequências e porcentagens. A relação entre as frequências fenotípicas do HLA e a presença de pênfigo vulgar e controles foi determinada pela razão de chances ou *odds ratio* (OR) mediante a regressão logística. Adicionalmente foram calculados os intervalos, com 95% de confiança, para os ORs.

Os testes estatísticos foram ajustados pela correção de Bonferroni dependendo da quantidade de frequências fenotípicas avaliadas para o HLA A, HLA B, HLA C, HLA DRB1, HLA DQA1 e HLA DQB1.

O nível de significância adotado foi de 5%, e no caso do HLA DQB1 considerados dois níveis de significância (1% e 5%) para a correção de Bonferroni.

Gráficos de barras para as frequências foram construídos para cada uma das frequências alélicas. Adicionalmente a representação do OR foi realizada utilizando o gráfico de *forest plot* como em estudos de metanálise.

Os dados foram armazenados e analisados por meio de dois *softwares* estatísticos: *SPSS for Windows* v.18 e *Stata* v.11.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

As características dos participantes do estudo (PV e controles) são mostradas na Tabela 3. Observou-se associação significativa entre os grupos e o gênero; a maioria dos casos com PV eram do gênero feminino (72,5%). Entre os controles a maioria era do gênero masculino (61,6%). Aproximadamente 55% dos casos com PV foram constatados em indivíduos de cor de pele branca, seguidos por pacientes de cor parda (31,4%) e negra (13,7%).

Tabela 3. Características dos pacientes com pênfigo vulgar e os controles.

Característica	Pênfigo vulgar	Controles	Total	Valor de p^1
	n = 51	n = 297		
	n (%)	n (%)		
<i>Gênero</i>				
Feminino	37 (72,5)	114 (38,4)	151	<0,001
Masculino	14 (27,5)	183 (61,6)	197	
<i>Cor da pele</i>				
Branca	28 (54,9)		28	
Negra	7 (13,7)		7	
Parda	16 (31,4)		16	

n = quantidade de indivíduos; ¹ Teste qui-quadrado de Pearson

Com relação aos sintomas otorrinolaringológicos, a odinofagia (92,2%), disfonia (78,4%) e sensação de corpo estranho (76,5%) foram mais frequentes, como mostra a Tabela 4. O envolvimento com a pele resultou mais frequente (78,4%) seguindo-se o envolvimento com a conjuntiva (64,7%).

Tabela 4. Sintomas otorrinolaringológicos dos pacientes com pênfigo vulgar.

Sintoma	Pênfigo vulgar
	n= 51 n (%)
<i><u>Sintomas otorrinolaringológicos</u></i>	
Obstrução nasal	30 (58,8)
Crostas nasais	33 (64,7)
Epistaxe	29 (56,9)
Rinorréia com raias de sangue	38 (74,5)
Disfagia	36 (70,6)
Odinofagia	47 (92,2)
Sensação de corpo estranho	39 (76,5)
Disfonia	40 (78,4)
<i><u>Envolvimento</u></i>	
Pele	40 (78,4)
Conjuntiva	33 (64,7)
Genitais	16 (31,4)
<i><u>Oroscopia</u></i>	
Com lesões ativas ou passadas	49 (96,1)
<i><u>Nasofibrolaringoscopia</u></i>	
Cavidade nasal e rinofaringe ¹	26 (65,0)
Hipofaringe ¹	32 (80,0)
Laringe ¹	22 (55,0)

n = quantidade de indivíduos; ¹ 11 casos sem informação

O cálculo do *odds ratio* (OR) foi realizado para as diferentes frequências alélicas do HLA A, HLA B, HLA C, HLA DRB1, HLA DQA1 e HLA DQB1. A razão de chances (*odds ratio* OR) foi calculada para cada uma das frequências alélicas do HLA pelo método da regressão logística com seus respectivos intervalos com 95% de confiança (IC_{95%}). Os resultados são apresentados nas Tabelas e Gráficos abaixo.

5.1 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA A em pacientes com PV e controles

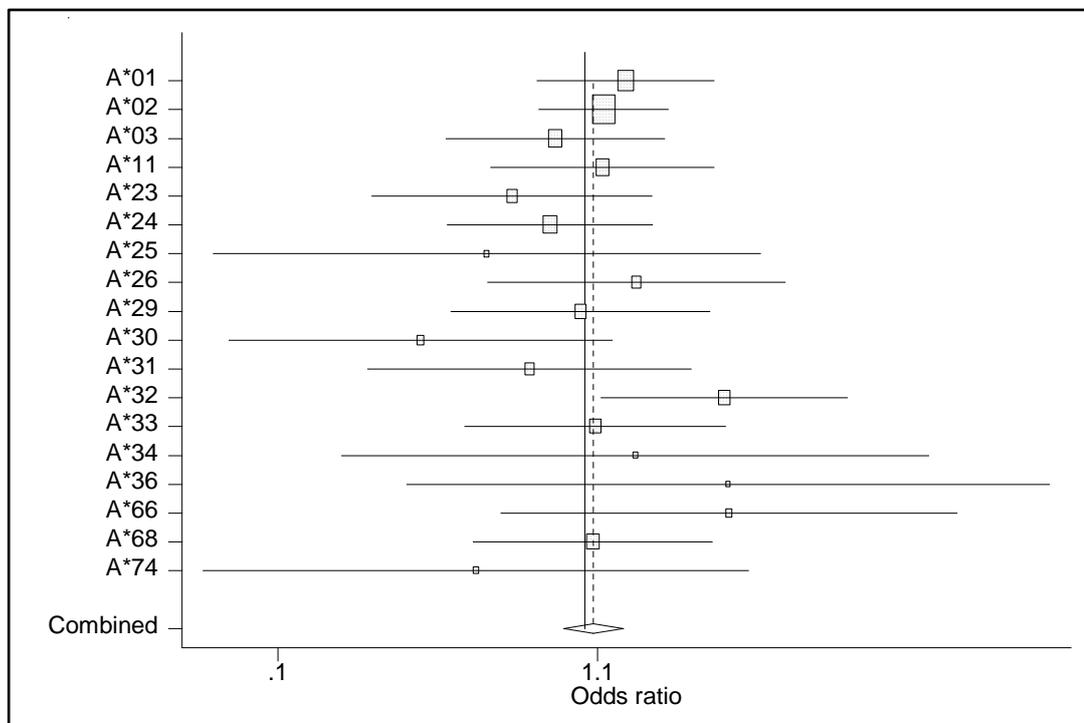
Não se observou associação significativa entre as frequências alélicas do HLA A nos pacientes com PV e controles (Tabela 5, Gráfico 1).

Tabela 5. Prevalência fenotípica dos alelos do HLA A em pacientes com pênfigo vulgar e os controles.

HLA A	Pênfigo vulgar n= 102	Controles n= 594	OR (IC _{95%})	Valor de p ^{1 §}
	n (%)	n (%)		
A*01	12 (11,8)	53 (8,9)	1,36 (0,70-2,65)	0,364
A*02	26 (25,5)	136 (22,9)	1,15 (0,71-1,87)	0,567
A*03	7 (6,9)	50 (8,4)	0,80 (0,35-1,82)	0,597
A*11	7 (6,9)	36 (6,1)	1,14 (0,49-2,64)	0,756
A*23	4 (3,9)	39 (6,6)	0,58 (0,20-1,66)	0,311
A*24	8 (7,8)	59 (9,9)	0,77 (0,36-1,67)	0,510
A*25	1 (1,0)	12 (2,0)	0,48 (0,06-3,73)	0,483
A*26	4 (3,9)	16 (2,7)	1,47 (0,48-4,50)	0,495
A*29	5 (4,9)	30 (5,1)	0,97 (0,37-2,56)	0,949
A*30	2 (2,0)	38 (6,4)	0,29 (0,07-1,23)	0,094
A*31	3 (2,9)	26 (4,4)	0,66 (0,20-2,23)	0,505
A*32	7 (6,9)	15 (2,5)	2,84 (1,13-7,16)	0,026
A*33	5 (4,9)	27 (4,5)	1,08 (0,41-2,88)	0,874
A*34	1 (1,0)	4 (0,7)	1,46 (0,16-13,20)	0,736
A*36	1 (1,0)	2 (0,3)	2,93 (0,26-32,62)	0,382
A*66	2 (2,0)	4 (0,7)	2,95 (0,53-16,32)	0,215
A*68	6 (5,9)	33 (5,6)	1,06 (0,43-2,60)	0,895
A*69	0	1 (0,2)	NA	NA
A*74	1 (1,0)	13 (2,2)	0,44 (0,06-3,42)	0,435

n = quantidade de indivíduos; OR (IC_{95%}): *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95%); NA: não avaliável; ¹ Valor de p para OR utilizando a regressão logística; [§] Nível de significância com correção de Bonferroni para $\alpha=0,05 \rightarrow \alpha/19 = 0,05/19 = 0,0026$

Gráfico 1. Razão de chances (*odds ratio* OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA A.



5.2 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA B em pacientes com PV e controles

Na análise do HLA B, encontrou-se associação entre o B*57 em pacientes com PV e controles ($p < 0,0012$). Outras frequências alélicas não mostraram ser estatisticamente significativas (Tabela 6, Gráfico 2).

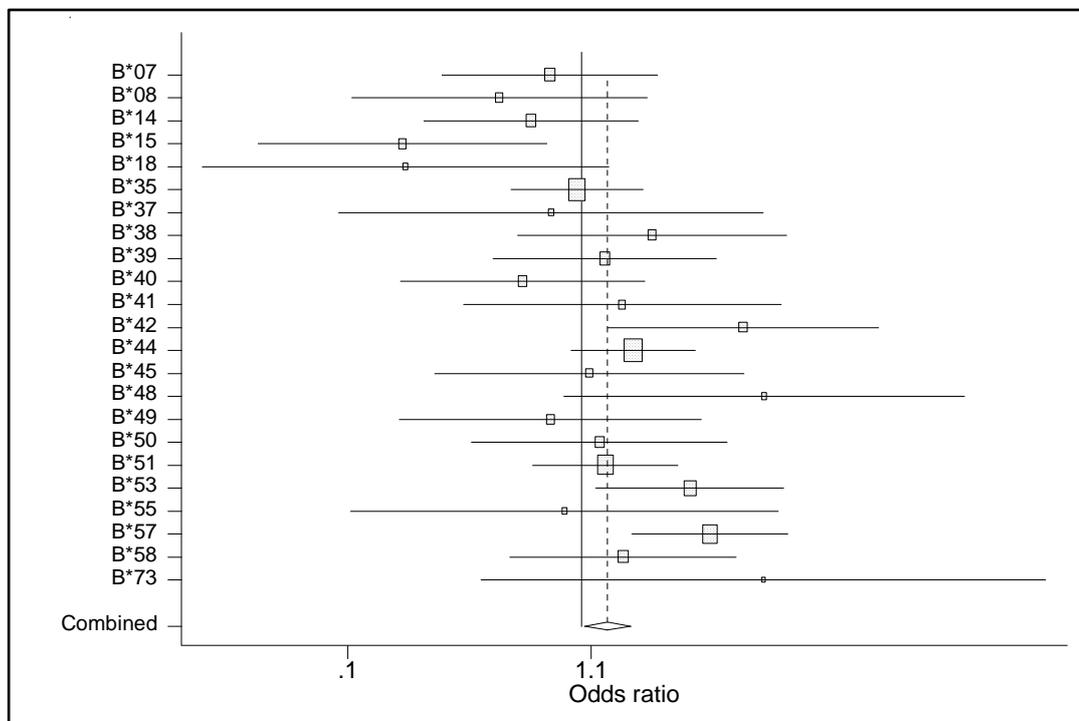
Tabela 6. Prevalência fenotípica dos alelos do HLA B em pacientes com pênfigo vulgar e os controles.

HLA B	Pênfigo vulgar n= 100	Controles n= 594	OR (IC _{95%})	Valor de $p^{1\ §}$
	n (%)	n (%)		
B*07	4 (4,0)	32 (5,4)	0,73 (0,25-2,12)	0,564
B*08	2 (2,2)	26 (4,4)	0,45 (0,10-1,91)	0,276
B*13	0	12 (2,0)	NA	NA
B*14	4 (4,0)	38 (6,4)	0,61 (0,21-1,75)	0,357
B*15	2 (2,0)	63 (10,6)	0,17 (0,04-0,72)	0,015
B*18	1 (1,0)	32 (5,4)	0,18 (0,02-1,31)	0,090
B*27	0	11 (1,9)	NA	NA
B*35	12 (12,0)	74 (12,5)	0,96 (0,50-1,84)	0,898
B*37	1 (1,0)	8 (1,3)	0,74 (0,09-5,98)	0,778
B*38	3 (3,0)	9 (1,5)	2,01 (0,54-7,56)	0,301
B*39	4 (4,0)	19 (3,2)	1,26 (0,42-3,79)	0,679
B*40	3 (3,0)	31 (5,2)	0,56 (0,17-1,87)	0,348
B*41	2 (2,0)	8 (1,3)	1,50 (0,31-7,14)	0,614
B*42	4 (4,0)	5 (0,8)	4,91 (1,30-18,60)	0,019
B*44	15 (15,0)	57 (9,6)	1,66 (0,90-3,07)	0,104
B*45	2 (2,0)	11 (1,9)	1,08 (0,24-4,95)	0,919
B*47	0	4 (0,7)	NA	NA
B*48	2 (2,0)	2 (0,3)	6,04 (0,84-43,39)	0,074
B*49	2 (2,0)	16 (2,7)	0,74 (0,17-3,26)	0,688
B*50	3 (3,0)	15 (2,5)	1,19 (0,34-4,20)	0,783
B*51	10 (10,0)	48 (8,1)	1,26 (0,62-2,59)	0,522
B*52	0	8 (1,3)	NA	NA
B*53	7 (7,0)	15 (2,5)	2,91 (1,15-7,32)	0,024
B*54	0	1 (0,2)	NA	NA
B*55	1 (1,0)	7 (1,2)	0,85 (0,10-6,96)	0,877
B*57	11 (11,0)	20 (3,4)	3,55 (1,64-7,65)	0,0012 [*]
B*58	4 (4,0)	16 (2,7)	1,51 (0,49-4,60)	0,473
B*73	1 (1,0)	1 (0,2)	5,99 (0,37-96,55)	0,207
B*81	0	5 (0,8)	NA	NA

n = quantidade de indivíduos; OR (IC_{95%}): *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95%); NA = não avaliável; ¹ Valor de p para OR utilizando a regressão logística; [§] Nível de significância com correção de Bonferroni para $\alpha = 0,05 \rightarrow \alpha/29 = 0,05/29 = 0,0017$;

^{*} significativo $p < 0,0017$.

Gráfico 2. Razão de chances (*odds ratio* OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA B.



5.3 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA C em pacientes com PV e controles

O alelo HLA C*15 foi estatisticamente significativo entre pacientes com PV e controles ($p < 0,0031$), isto é, indivíduos com o HLA C*15 têm chance três vezes maior de ter pênfigo vulgar comparada com pessoas que não tem o HLA C*15 presente (Tabela 7, Gráficos 3 e 4).

Tabela 7. Prevalência fenotípica dos alelos do HLA C em pacientes com pênfigo vulgar e os controles.

HLA C	Pênfigo vulgar n= 100	Controles n= 592	OR (IC _{95%})	Valor de p ^{1 §}
	n (%)	n (%)		
C*01	1 (1,0)	14 (2,4)	0,42 (0,05-3,21)	0,401
C*02	3 (3,0)	33 (5,6)	0,52 (0,16-1,74)	0,292
C*03	5 (5,0)	70 (11,8)	0,392 (0,15-1,00)	0,050
C*04	18 (18,0)	99 (16,7)	1,09 (0,63-1,90)	0,753
C*05	7 (7,0)	31 (5,2)	1,36 (0,58-3,18)	0,476
C*06	15 (15,0)	60 (10,1)	1,57 (0,85-2,88)	0,151
C*07	12 (12,0)	111 (18,8)	0,59 (0,31-1,12)	0,106
C*08	6 (6,0)	44 (7,4)	0,80 (0,33-1,92)	0,610
C*12	6 (6,0)	37 (6,3)	0,96 (0,39-2,33)	0,924
C*14	2 (2,0)	20 (3,4)	0,58 (0,13-2,54)	0,473
C*15	12 (12,0)	26 (4,4)	2,97 (1,45-6,10)	0,003*
C*16	8 (8,0)	29 (4,9)	1,69 (0,75-3,81)	0,207
C*17	4 (4,0)	10 (1,7)	2,43 (0,75-7,89)	0,141
C*18	1 (1,0)	8 (1,4)	0,74 (0,09-5,96)	0,775

n = quantidade de indivíduos; OR (IC_{95%}): *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95%); NA = não avaliável; ¹ Valor de p para OR utilizando a regressão logística; [§] Nível de significância com correção de Bonferroni para $\alpha=0,05 \rightarrow \alpha/14 = 0,05/14 = 0,0036$; * significativo $p<0,0036$.

Gráfico 3. Frequências alélicas do HLA C em pacientes com pênfigo vulgar e controles.

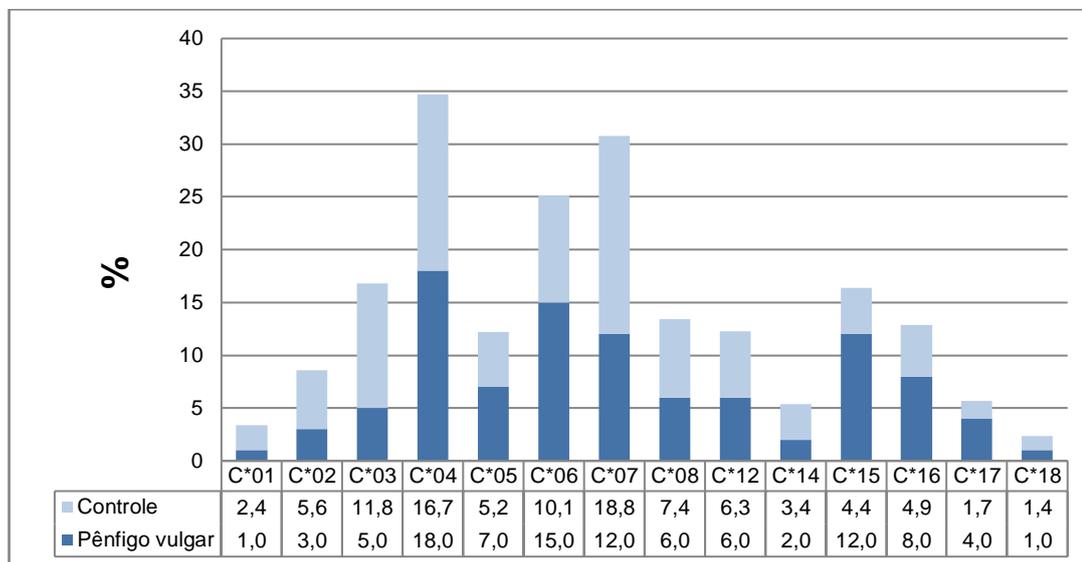
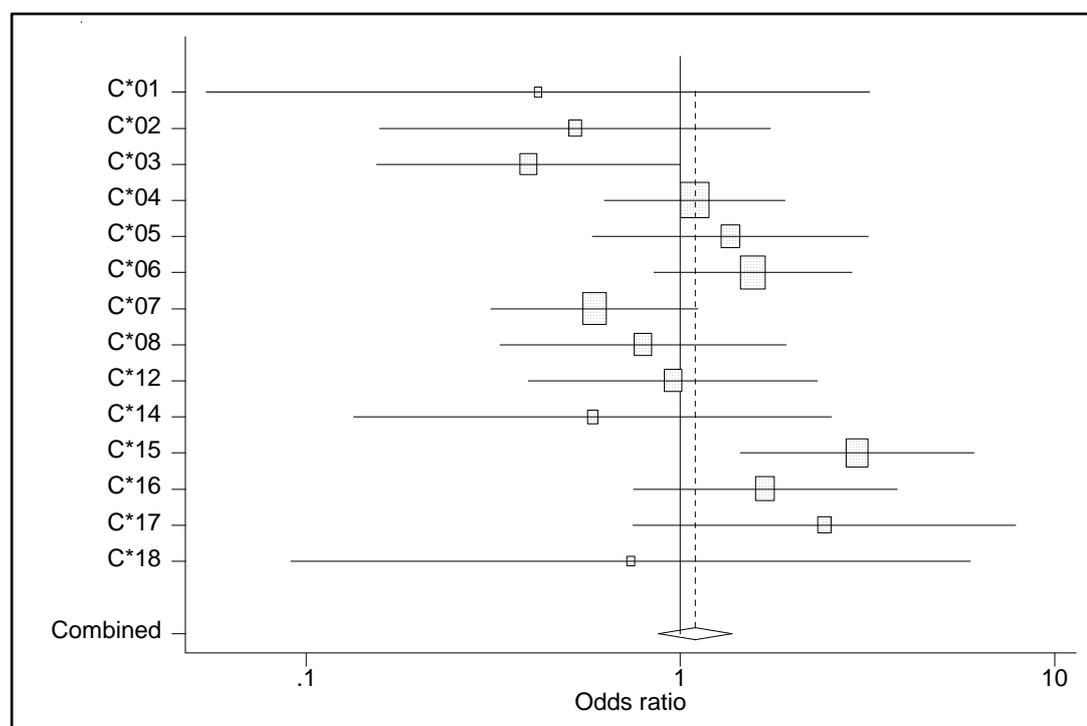


Gráfico 4. Razão de chances (*odds ratio* OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA C.



5.4 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DRB1 em pacientes com PV e nos controles

A Tabela 8 e os Gráficos 5 e 6 apresentam os resultados para o HLA DRB1. A presença dos alelos DRB1*04, DRB1*08 e DRB1*14, de forma independente, aumenta a chance de comparar pacientes com pênfigo vulgar com aqueles indivíduos que não apresentam esses alelos ($p < 0,0008$).

Tabela 8. Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DRB1 em pacientes com pênfigo vulgar e os controles.

HLA DRB1	Pênfigo vulgar n= 102	Controles n= 594	OR (IC _{95%})	Valor de p^1 §
	n (%)	n (%)		
DRB1*01	2 (2,0)	61 (10,3)	0,18 (0,04-0,73)	0,016
DRB1*03	4 (3,9)	66 (11,1)	0,33 (0,12-0,92)	0,034
DRB1*04	29 (28,4)	66 (11,1)	3,18 (1,93-5,24)	0,000x*
DRB1*07	8 (7,8)	80 (13,5)	0,55 (0,26-1,17)	0,119
DRB1*08	18 (17,6)	40 (6,7)	2,97 (1,63-5,42)	0,0004*
DRB1*09	1 (1,0)	9 (1,5)	0,64 (0,08-5,14)	0,677
DRB1*10	3 (2,9)	13 (2,2)	1,35 (0,38-4,84)	0,641
DRB1*11	11 (10,8)	52 (8,8)	1,26 (0,63-2,51)	0,510
DRB1*12	1 (1,0)	16 (2,7)	0,36 (0,05-2,73)	0,321
DRB1*13	4 (3,9)	81 (13,6)	0,26 (0,09-0,72)	0,010
DRB1*14	16 (15,7)	30 (5,1)	3,50 (1,83-6,69)	0,0002*
DRB1*15	3 (2,9)	61 (10,3)	0,27 (0,08-0,86)	0,027
DRB1*16	2 (2,0)	19 (3,2)	0,61 (0,14-2,64)	0,504

OR (IC_{95%}) = *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95%); NA = não avaliável, ¹ Valor de p para OR utilizando a regressão logística, § Nível de significância com correção de Bonferroni para $\alpha=0,05 \rightarrow \alpha/13 = 0,05/13 = 0,0038$ ou $\alpha=0,01 \rightarrow \alpha/13 = 0,01/13 = 0,0008$; * significativo $p < 0,0008$.

Gráfico 5. Frequências alélicas do HLA DRB1 em pacientes com pênfigo vulgar e controles.

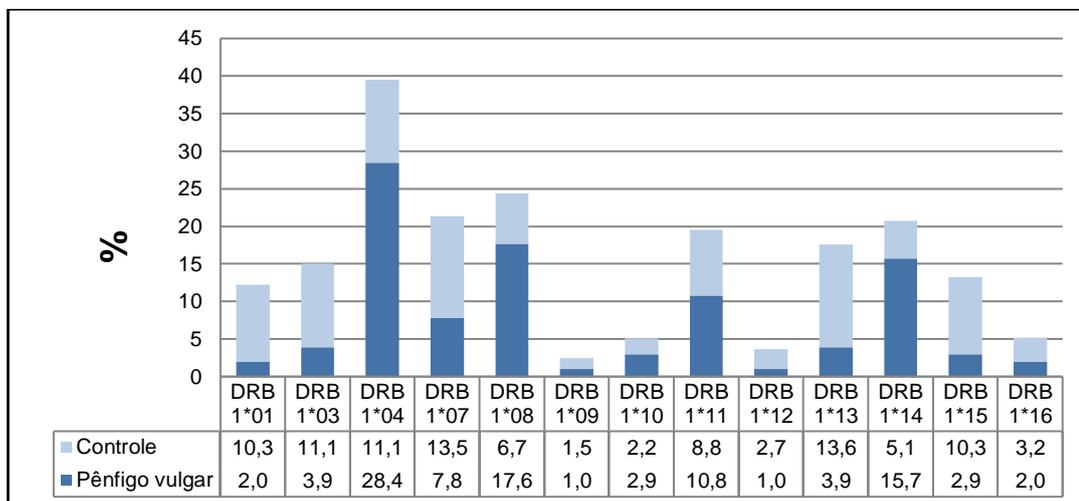
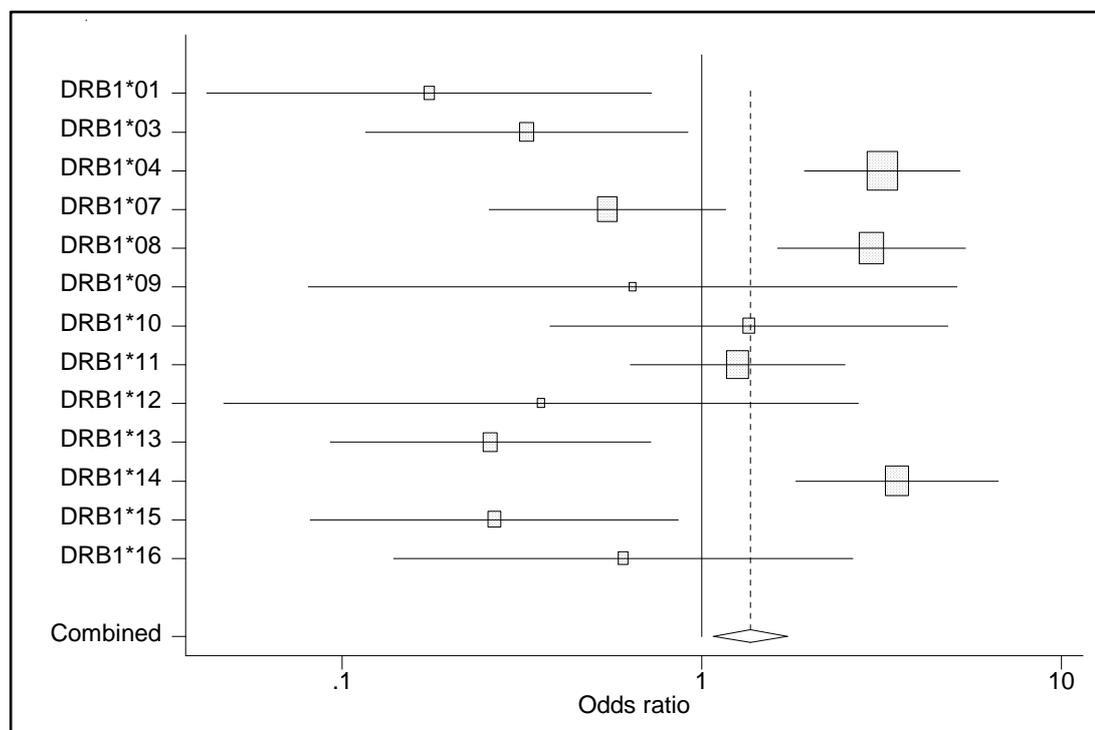


Gráfico 6. Razão de chances (*odds ratio* OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA DRB1.



5.5 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DQA1 em pacientes com PV e os controles

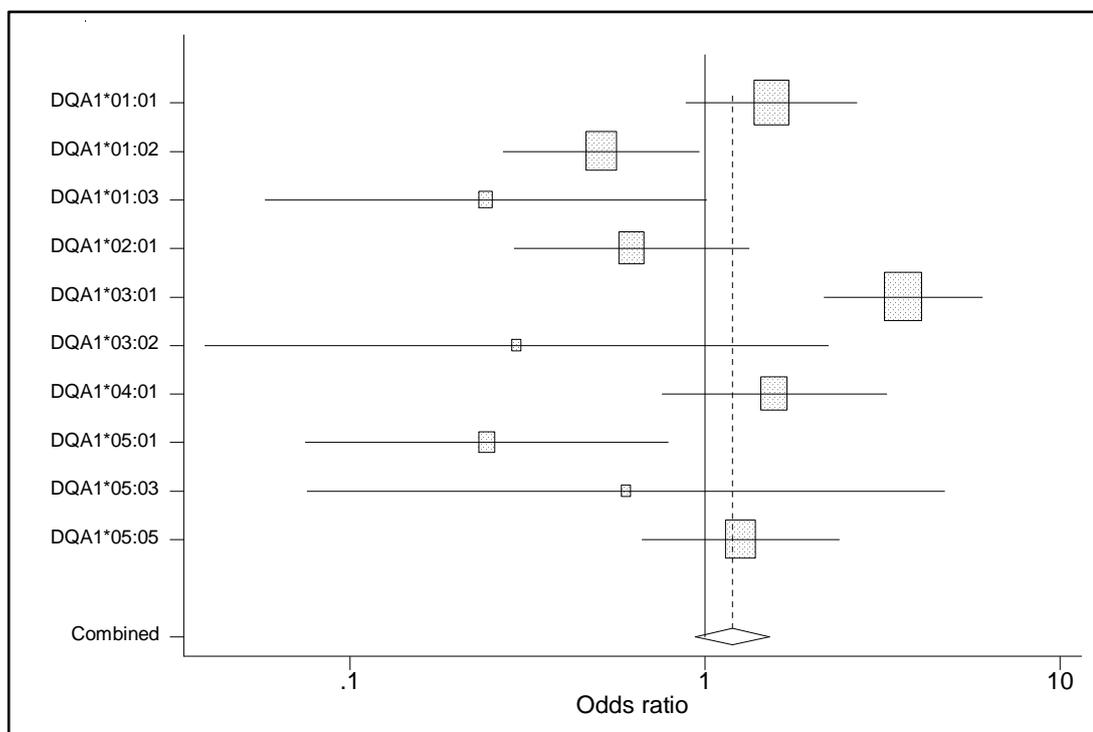
Na Tabela 9 e Gráfico 7 observa-se que a presença do alelo DQA1*03:01 aumenta em quase quatro vezes a chance de um indivíduo ter pênfigo vulgar, quando comparado com indivíduos que não apresentam esse alelo.

Tabela 9. Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DQA1 em pacientes com pênfigo vulgar e os controles.

HLA DQA1	Pênfigo vulgar n= 102	Controles n= 594	OR (IC _{95%})	Valor de $p^{1\ §}$
	n (%)	n (%)		
DQA1*01:01	19 (19,4)	80 (13,5)	1,55 (0,88-2,69)	0,123
DQA1*01:02	12 (12,2)	127 (21,4)	0,51 (0,27-0,97)	0,039
DQA1*01:03	2 (2,0)	47 (7,9)	0,24 (0,06-1,02)	0,052
DQA1*02:01	8 (8,2)	74 (12,5)	0,63 (0,29-1,34)	0,227
DQA1*03:01	28 (28,6)	59 (9,9)	3,63 (2,17-6,07)	0,000x*
DQA1*03:02	1 (1,0)	20 (3,4)	0,30 (0,04-2,23)	0,237
DQA1*04:01	10 (10,2)	40 (6,7)	1,57 (0,76-3,26)	0,222
DQA1*04:02	0	1 (0,2)	NA	NA
DQA1*04:03	1 (1,0)	0	NA	NA
DQA1*05:01	3 (3,1)	68 (11,4)	0,24 (0,08-0,79)	0,019
DQA1*05:03	1 (1,0)	10 (1,7)	0,60 (0,08-4,76)	0,630
DQA1*05:05	13 (13,3)	64 (10,8)	1,27 (0,67-2,40)	0,468
DQA1*06:01	0	3 (0,5)	NA	NA

n = quantidade de indivíduos; OR (IC_{95%}): *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95%); NA = não avaliável; ¹ Valor de p para OR utilizando a regressão logística; [§] Nível de significância com correção de Bonferroni para $\alpha=0,05 \rightarrow \alpha/10 = 0,05/10 = 0,005$ ou $\alpha=0,01 \rightarrow \alpha/10 = 0,01/10 = 0,001$; * significativo $p<0,001$.

Gráfico 7. Razão de chances (*odds ratio* OR) em pacientes com pênfigo vulgar e controles para o HLA DQA1.



5.6 Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DQB1 em pacientes com PV e os controles

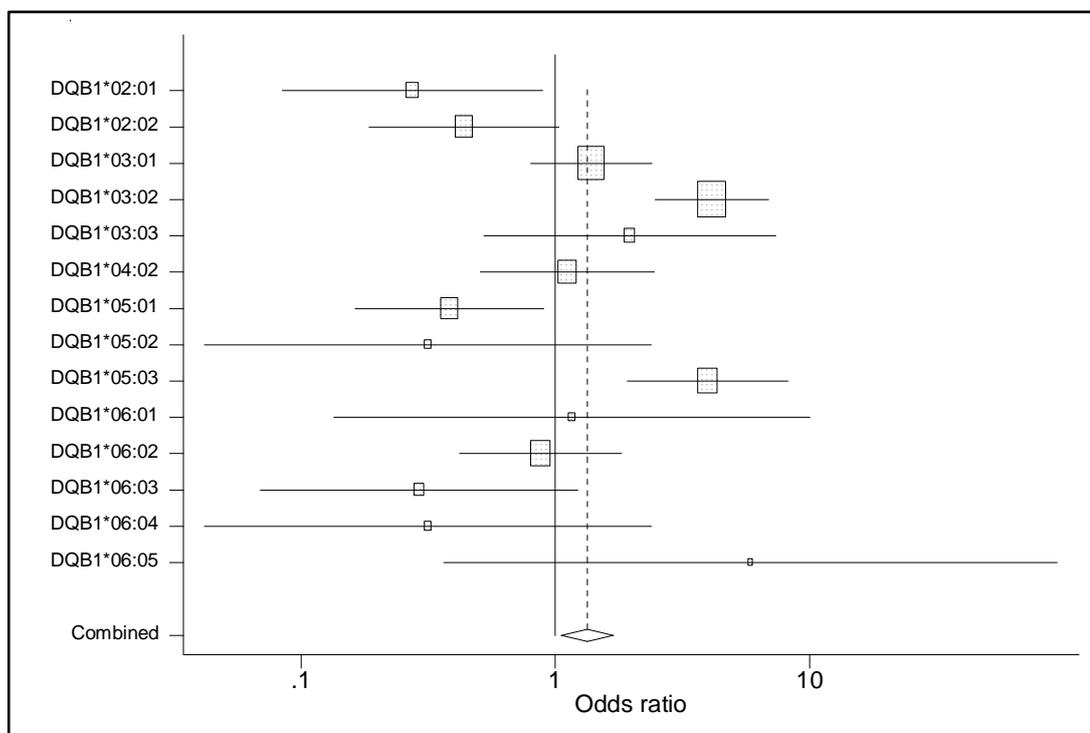
Os alelos DQB1*03:02 e DQB1*05:03 apresentaram valores de ORs estatisticamente significativos. Indivíduos com presença de DQB1*03:02 aumentam a chance de ter pênfigo vulgar em aproximadamente quatro vezes quando comparada com indivíduos que não tem esse alelo. Do mesmo modo, também os indivíduos que apresentam o alelo DQB1*05:03 têm chance quatro vezes maior de ter pênfigo vulgar quando comparados com indivíduos nos quais este alelo não é encontrado (Tabela 10, Gráfico 8).

Tabela 10. Prevalência fenotípica dos alelos do HLA DQB1 em pacientes com pênfigo vulgar e os controles.

HLA DQB1	Pênfigo vulgar n= 102	Controles n= 594	OR (IC _{95%})	Valor de p ^{1 §}
	n (%)	n (%)		
DQB1*02:01	3 (2,9)	59 (9,9)	3,64 (1,12-11,84)	0,032
DQB1*02:02	6 (5,9)	74 (12,5)	0,44 (0,19-1,04)	0,061
DQB1*02:03	0	1 (0,2)	NA	NA
DQB1*03:01	19 (18,6)	84 (14,1)	1,39 (0,80-2,41)	0,240
DQB1*03:02	29 (28,4)	52 (8,8)	4,14 (2,47-6,94)	0,000x**
DQB1*03:03	3 (2,9)	9 (1,5)	1,97 (0,52-7,40)	0,316
DQB1*03:04	0	1 (0,2)	NA	NA
DQB1*03:19	0	13 (2,2)	NA	NA
DQB1*04:01	0	2 (0,3)	NA	NA
DQB1*04:02	8 (7,8)	42 (7,1)	1,12 (0,51-2,46)	0,780
DQB1*04:04	0	2 (0,3)	NA	NA
DQB1*05:01	6 (5,9)	83 (14,0)	0,39 (0,16-0,91)	0,029
DQB1*05:02	1 (1,0)	18 (3,0)	0,32 (0,04-2,40)	0,266
DQB1*05:03	13 (12,7)	21 (3,5)	3,99 (1,93-8,24)	0,002*
DQB1*05:07	0	2 (0,3)	NA	NA
DQB1*06:01	1 (1,0)	5 (0,8)	1,17 (0,14-10,09)	0,889
DQB1*06:02	9 (8,8)	59 (9,9)	0,88 (0,42-1,83)	0,728
DQB1*06:03	2 (2,0)	38 (6,4)	0,09 (0,07-1,23)	0,094
DQB1*06:04	1 (1,0)	18 (3,0)	0,32 (0,04-2,40)	0,266
DQB1*06:05	1 (1,0)	1 (0,2)	5,87 (0,36-94,62)	0,212
DQB1*06:08	0	1 (0,2)	NA	NA
DQB1*06:09	0	3 (0,5)	NA	NA
DQB1*06:11	0	4 (0,7)	NA	NA
DQB1*06:19	0	1 (0,2)	NA	NA
DQB1*06:27	0	1 (0,2)	NA	NA

n = quantidade de indivíduos; OR (IC_{95%}): *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95%); NA = não avaliável; ¹ Valor de p para OR utilizando a regressão logística; § Nível de significância com correção de Bonferroni para $\alpha=0,05 \rightarrow \alpha/14= 0,05/14 = 0,0036$ ou $\alpha=0,01 \rightarrow \alpha/14 = 0,01/14 = 0,0007$; * significativo $p<0,0036$; ** significativo $p<0,0007$.

Gráfico 8. Razão de chances (*odds ratio* OR) em pacientes com pêfigo vulgar e controles para o HLA DQB1.



5.7 Prevalência dos haplótipos DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 e DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 em pacientes com PV e os controles

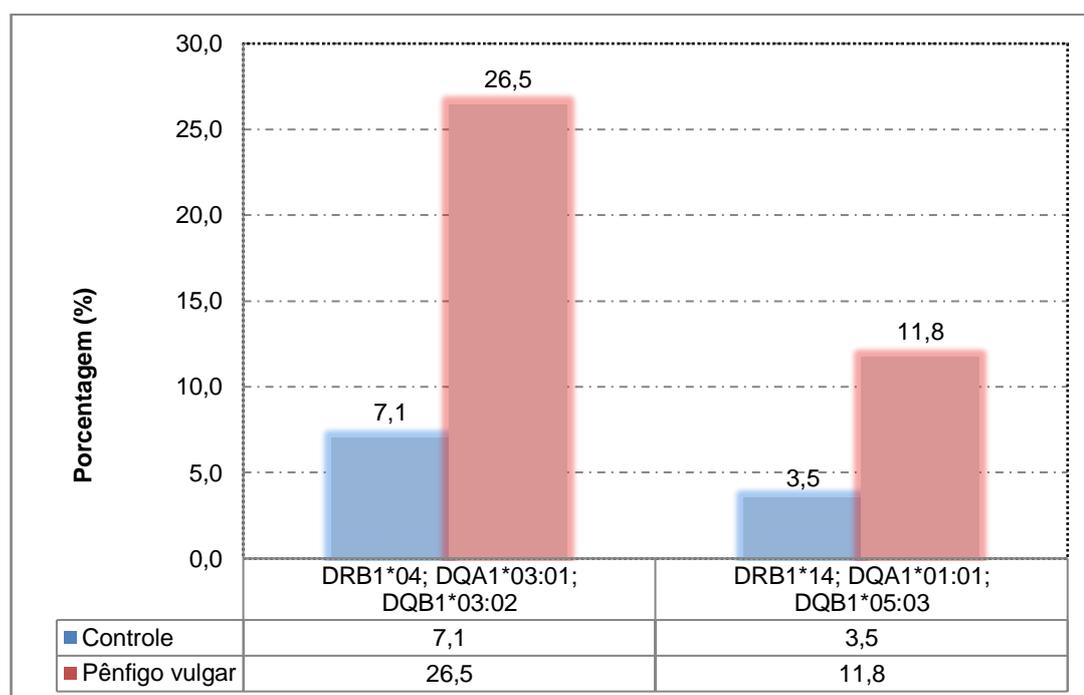
Indivíduos com o haplótipo DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 têm chance 4,7 vezes maior de ter pêfigo vulgar comparada com indivíduos que não apresentam esse haplótipo ($p < 0,001$). Também foi observado que a presença do haplótipo DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 está associada com a presença de pêfigo vulgar ($p < 0,001$) (Tabela 11, Gráfico 9).

Tabela 11. Prevalência dos haplótipos DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 e DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 para os pacientes com pênfigo vulgar e os controles.

HLA DQA1	Pênfigo vulgar	Controles	OR (IC _{95%})	Valor de p ^{1 §}
	n= 102 n (%)	n= 594 n (%)		
DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02	27 (26,5)	42 (7,1)	4,73 (2,76-8,12)	0,000x ^{8*}
DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03	12 (11,8)	21 (3,5)	3,64 (1,73-7,65)	0,000x ^{**}

n = quantidade de indivíduos; OR (IC_{95%}): *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95%); ¹ Valor de p para OR utilizando a regressão logística; § Nível de significância de $\alpha=0,05$; * significativo $p<0,005$; ** significativo $p<0,001$.

Gráfico 9. Prevalência dos haplótipos DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 e DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 em pacientes com pênfigo vulgar e controles.



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O pênfigo vulgar é uma doença bolhosa com morbidade e mortalidade altas, quando não tratada adequadamente. Em longo prazo esta doença requer, mais comumente, tratamento com corticosteroides. Tal terapia pode estar associada a efeitos colaterais severos, como infecções oportunistas, hipertensão, osteoporose, úlceras gastrointestinais, diabetes, síndrome de Cushing. Por isso, é urgente e necessário entender detalhadamente sua etiologia e patogênese [52, 89].

A associação entre os alelos do sistema HLA de classe I (A e B) e de classe II (DR) já foi descrita para a população brasileira [2]. No presente estudo, foi possível complementar essa avaliação com os alelos do sistema HLA C e DQB1 e DQA1 de alta resolução, além de aumentar esta casuística e trazer, assim, informações completas referentes à associação entre os alelos de HLA e o PV na mesma população, para identificar aqueles associados à gênese desta doença.

6.1 Desenho do estudo e composição dos grupos de casos e controles

Os estudos de associação genética objetivam correlacionar diferenças em frequências alélicas em dois grupos distintos. O método mais simples é por meio de um estudo caso-controle. Este tipo de desenho de estudo permite observar as diferenças encontradas entre as frequências dos alelos que

realmente se relacionam com a doença ^[90], entretanto, sabe-se que as frequências alélicas variam muito dentre as populações, independentemente da presença ou não de doenças. Esta disparidade de frequências é causada pela história genética e social única, bem como padrões de migração geográfica e de miscigenação, entre outros, sem haver correlação com a doença estudada o que pode levar a resultados falso-positivos ^[90].

A incidência mundial estimada de pênfigo vulgar varia de 0,76 a 6,7 casos para cada milhão de habitantes ^[52]. Por causa desta prevalência baixa, um estudo de coorte se torna inviável, uma vez que, para o seguimento de uma quantidade adequada de casos, seriam necessários coortes com quantidade de indivíduos estimada em milhões.

No presente estudo o grupo de casos foi constituído por 51 pacientes com diagnóstico confirmado de PV que estavam sendo acompanhados no ambulatório de Otorrinolaringologia da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas - FMUSP. Do total desses 51 pacientes, havia 37 com DNA previamente extraído em trabalho prévio realizado por Weber et al.^[2], porém cinco foram excluídos por inviabilidade da amostra de DNA e um caso por já ter sido identificada consanguinidade, totalizando 31 pacientes com DNA viável ^[2] e 20 pacientes novos, recrutados no mesmo ambulatório. Apesar de raro ^[1], pacientes consanguíneos não devem ser aceitos em estudos caso-controle de frequências alélicas, uma vez que há o risco de aumento da frequência de determinados alelos presentes em uma certa família e que não sejam responsáveis pelo risco de desenvolver a doença ^[78, 90]. Os 297 doadores-cadáveres do Sistema Estadual de

Transplantes da Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo compuseram o grupo controle. Este grupo controle já possuía uma base de dados no Laboratório de Imunologia dos Transplantes do InCor com a tipificação de HLA de classe I A, B e C e classe II DR de baixa resolução, DQA1 e DQB1 de alta resolução. Com relação ao gênero, a maioria dos casos de PV eram mulheres e no grupo controle a maioria era de homens. Apesar disso, pode-se considerar esta diferença sem significância, uma vez que, assim como uma variedade de doenças autoimunes, o PV está associado aos antígenos de HLA classe II, especificamente DR e DQ, que estão localizados no braço curto do cromossomo 6 e não nos cromossomos sexuais ^[40].

A incidência de PV tem se mostrado mais elevada para o gênero feminino, com uma média de 66% dos casos reportados na literatura ^[61] que mostra um padrão de predominância feminina, assim como para outras doenças autoimunes como a síndrome de Sjogren, lúpus eritematoso sistêmico, doenças autoimunes da tireoide e esclerodermia, artrite reumatoide, Esclerose Múltipla e Miastenia Gravis ^[91]. O grupo de pacientes com PV, aqui estudado, seguiu este padrão de predominância (72,5% dos casos foram observados em mulheres).

Essa predominância, especula-se ser oriunda de uma resposta imune diferenciada entre as mulheres, com aumento da quantidade absoluta de linfócitos CD4+ quando comparada ao de homens, bem como, o efeito dos hormônios sexuais na resposta imune, exemplificado pela flutuação de doenças autoimunes durante a gestação. Os hormônios sexuais podem agir

diretamente no sistema imune, modulando a apresentação de antígenos, a ativação linfocitária, expressão de citocinas e células imunes ^[91].

A estratificação, para validar um estudo caso-controle, é a razão mais comum da não replicabilidade. Existe, porém, uma dúvida crescente acerca da estratificação que pode não ser tão fundamental para a validade de um estudo genético, principalmente em grupos com uma variedade étnica como a aqui estudada, podendo este ser apenas um fator menos importante ou irrelevante ^[90].

No presente estudo, os dados quanto à cor da pele foram coletados de maneira subjetiva, e não foi possível obter dados da população controle. Todos os pacientes analisados com PV eram nascidos e tinham pais nascidos no Brasil, bem como, faziam acompanhamento ambulatorial na cidade de São Paulo. Todos os controles eram pacientes brasileiros saudáveis falecidos na cidade de São Paulo, estado de São Paulo, Brasil.

Os alelos estudados podem ser verificados em muitas gerações subsequentes. Provavelmente os alelos que conferem susceptibilidade ao PV foram trazidos por imigrantes do oriente médio e mediterrâneo. O Brasil, particularmente São Paulo, é interessante de ser estudado, uma vez que com a miscigenação tão intensa, os genes que são específicos de determinadas populações misturaram-se com os de outras, facilitando estudos de associação genética. No presente estudo, por exemplo, o alelo de um paciente pode ter sido herdado de um imigrante italiano que imigrou em 1800.

Segundo Pimenta et al. ^[53], no Brasil, em um nível individual, a cor determinada subjetivamente ou pelo exame físico é um preditor pobre de ancestralidade genômica, que aponta para o risco de equiparar cor ou raça com ancestralidade geográfica por meio de termos como Branco, Caucasiano e Europeu de um lado e Negro ou Africano do outro.

O fato de a população de São Paulo, ser uma das mais heterogêneas do mundo, a ausência de estratificação populacional não deve aumentar a probabilidade de ocorrência de resultados equivocados, uma vez que a procedência de todos os pacientes foi da mesma localidade. A miscigenação que ocorreu com toda a população brasileira desde o ano 1500, conferiu características singulares que se tornam favoráveis aos estudos de associação, uma vez que os genes que realmente estiverem ligados a uma certa doença em estudo têm mais chance de aparecer do que serem um falso-positivo, por causa da ancestralidade ^[2]. Em geral, para qualquer estudo caso-controle bem desenhado, a fonte da população da qual os controles são coletados deve ser a mesma dos casos ^[90].

6.2 Associações entre alelos do sistema HLA e Pênfigo Vulgar

No presente estudo constatou-se associação entre os antígenos de classe I e II de HLA e PV. Dos alelos de classe I, existe associação entre B*57 e C*15. Dos alelos de classe II, DRB1*04, DRB1*08 e DRB1*14 a associação

também foi significativa, bem como a dos DQA1*03:01, DQB1*03:02 e DQB1*05:03.

Até o momento, o método mais usado para identificar os genes participantes na susceptibilidade ao pênfigo têm sido os estudos caso-controle populacionais que testam alguns genes que sabidamente exercem um papel na doença. Esse método tem demonstrado que o *locus* MHC (HLA classe II) está associado ao PV. Outros estudos, que abordaram genes diferentes, ou mostraram resultados negativos ou desfechos inconsistentes [23].

Os alelos de HLA classe I não têm sido apontados como funcionais, e não afetam diretamente o fenótipo da doença, podendo estar presentes em maior intensidade em pacientes com pênfigo vulgar, em razão de seu haplótipo, como é o caso do HLA-B38 com o seu haplótipo HLA-B38, DRB1*04:02, DQB1*03:02 ou o HLA-B35 com o seu haplótipo HLA B-35, DRB1*04:02, DQB1*03:02 [92].

Na análise aqui desenvolvida não foi constatada associação entre o alelo de HLA classe I A e o PV. Na população brasileira um único estudo mostrou que existe associação entre HLA-A*26 e PV [93], assim como a associação deste alelo em pacientes japoneses [35, 93] e judeus também diagnosticados com PV [38].

O presente estudo complementa o de Weber et al. [2] quanto a dosagem de HLA classe I C, bem como de DQA1 e DQB1 de alta resolução.

Na amostra aqui estudada, o alelo B*57 esteve presente em 11% dos casos e apenas em 3,4% dos controles, com nível de significância de 0,0012

após a correção de Bonferroni para testes múltiplos (Tabela 6). Não há relatos na literatura sobre a correlação entre o alelo B*57 e o PV em outras populações. Na população da Sardenha ^[45] o alelo B*35 está relacionado ao fato de ser promotor de susceptibilidade ao PV. O B*38 já foi descrito em estudos para a população brasileira ^[93], bem como para as populações judaica ^[38] e espanhola ^[27]. Na população iraniana, por exemplo, foi observada associação do PV com a presença do alelo B*44:02 ^[30].

A literatura registra que os alelos C*04, C*05 e C*12 aumentam o risco ao PV na população sarda e brasileira ^[45, 93], bem como em um estudo iraniano com 50 pacientes diagnosticados com PV, comparados com uma população controle, no qual os alelos C*04:01 ($p < 0,001$), C*15:02 ($p < 0,001$), C*16:01 ($p < 0,027$) também foram observados ^[94]. No estudo iraniano, assim como no presente estudo, foi observado o alelo C*15 que mostrou um risco três vezes maior quando comparado com aqueles casos em que não tenha sido detectado. Na população iraniana este alelo estava presente em 12% dos pacientes e em apenas 4,4% dos controles ^[94] o que corrobora com o presente estudo na população brasileira.

A metanálise realizada a partir de 18 estudos acerca dos polimorfismos de HLA-DRB mostrou que os alelos DRB1*04, DRB1*08 e DRB1*14 aumentam a susceptibilidade ao PV ^[52]. O estudo aqui desenvolvido, aponta exatamente para o mesmo resultado, tendo-se verificado que estes mesmos alelos conferiram risco aumentado ao PV na população brasileira.

Por limitação de acesso ao DNA da população controle, de doadores cadáveres da cidade de São Paulo, não foi possível obter a tipagem de alta resolução de DR, entretanto, acredita-se que de acordo com a explanação dada a seguir, ela não seria necessária.

O alelo DRB1*04 estava presente em 29 (28,4%) dos casos, e em apenas 66 (11,1%) dos controles, com OR 3,18 (1,93-5,24) e $p = 5,971 \times 10^{-6}$. Destes 29 casos com alelo DRB1*04, após a realização de tipificação de DNA de alta resolução, foi verificado que 28 deles eram DRB1*04:02 (96,55%), enquanto apenas 1 caso era DRB1*04:06. A presença do alelo DRB1*04:02 se confirma em praticamente todos os estudos consultados que avaliaram o HLA-DR, exceto no referente às populações mexicana ^[39] e paquistanesa ^[44].

Todos os pacientes com o alelo DRB1*04:02 faziam parte do haplótipo HLA-DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02. Este haplótipo, ou seja, em pacientes que possuíam estes três alelos simultaneamente, foi constatado em 27 (26,5%) dos casos e em apenas 42 (7,1%) dos controles, com uma razão de chances de 4,73 (2,76-8,12) (Tabela 11). A presença deste haplótipo reforça a teoria de que os fatores genéticos envolvidos na susceptibilidade ao PV são teloméricos ao *locus* DP e, mais provavelmente, posicionado entre a região DR e DQ. A questão que surge é se esses fatores coincidem com a região DR e/ou com a região DQ.

Observou-se o alelo DQA1*03:01 em 28,6% dos casos e 9,9% dos controles, OR = 3,63 (2,17-6,07) (Tabela 9). Tal associação já foi feita em pacientes do Irã e judeus Ashkenazi ^[30], da Itália e Sardenha ^[43, 45] e em norte-

americanos caucasianos [43]. Em todos esses estudos citados [30, 43, 45] foi observado o haplótipo HLA*DRB1*04:02-DQA1*03:01-DQB1*03:02, assim como em todos os casos do presente estudo. Todos os pacientes que possuíam o alelo DQA1*03:01 também possuíam o DRB1*04:02.

O alelo DQA1*03:01 e o alelo DQB1*03:02 compõem o haplótipo HLA*DRB1*04:02-DQA1*03:01-DQB1*03:02 encontrado em 28,4% dos casos e 8,8% dos controles, OR = 4,14 (2,47-6,94) (Tabela 10). Pacientes da França [23], Argentina [26], Espanha [27], Sardenha [45], Turquia [46], Oriente Médio [48], Eslováquia [49] e Canadá [50] também apontaram este alelo à susceptibilidade ao PV. O desequilíbrio de ligação entre DRB1*04:02 e DQB1*03:02 fica evidente porque todos os pacientes com DQB1*03:02 compartilhavam os dois alelos.

Em 18 casos (17,6%) e 40 controles (6,7%) o DRB1*08 foi pontuado, conferindo um OR = 2,97 (1,63-5,42) com p significativo (Tabela 8). Destes 18 casos, após a tipagem de alta resolução foi verificado que apenas três casos (16,67%) não eram HLA-DRB1*08:04 (83,33%), mas DRB1*08:01, DRB1*08:03 e DRB1*08:06.

A frequência de DRB1*08 verificada na população controle presente, vai ao encontro com aquela encontrada na população da região de São Paulo, mesmo local da realização do presente estudo, isto é, de 10,0% [95]. O alelo DRB1*08, aqui encontrado, confere um risco três vezes maior da pessoa ter PV quando comparado com a população controle. A associação entre DRB1*08 e PV já foi demonstrada em pacientes do Brasil, da Sardenha e

Itália [2, 45, 93]. Os haplótipos mais comumente associados ao DRB1*08 são DRB1*08-DQA1*04:01-DQB1*03:01, DRB1*08-DQA1*04:01-DQB1*04:02, DRB1*08-DQA1*05:01-DQB1*03:01 [95, 96]. Como nenhum desses alelos de DQA1 ou de DQB1 foi considerado como promotor de susceptibilidade ao PV no presente estudo, infere-se que a presença do alelo DRB1*08 confere risco particular ao desenvolvimento do pênfigo vulgar, especificamente o alelo DRB1*08:04, por estar presente em 83,33% dos casos de DRB1*08.

A associação do DRB1*14 verificada é provavelmente causada por desequilíbrio de ligação com o DQB1*05:03 [52]. Na presente pesquisa o DRB1*14 estava presente em 16 casos (15,7%) e 30 controles (5,1%), OR = 3,5 (1,83-6,69) (Tabela 8). Quatorze destes 16 casos, após a tipagem de alta resolução, eram HLA-DRB1*14:01 (87,5%), um paciente possuía HLA-DRB1*14:02 e outro HLA-DRB1*14:04. O haplótipo DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 também confere risco ao PV com OR = 3,64 (1,73-7,65) quando comparado com a população controle estudada (Tabela 11).

O DQB1*05:03 foi verificado em 12,7% dos casos e apenas 3,5% dos controles, OR = 3,99 (1,93-8,24) (Tabela 10). A presença de um risco aumentado ao PV em razão do alelo DQB1*05:03, bem como o haplótipo DRB1*14:01-DQB1*05:03, já foi descrita para pacientes turcos [11], argentinos [26], espanhóis [27], franceses [28], iranianos [30], italianos [32], japoneses [36], norte-americanos [43], sardenhos [45], e canadenses [50].

A correlação entre os genes de HLA classe II e PV já foi mostrada em diversos estudos e, apesar disso, os mecanismos pelos quais ocorre ainda

não está inteiramente esclarecida. Sabe-se que o alelo DRB1*04:02 possui um bolsão denominado P4 de carga negativa e, por isso, somente peptídeos que possuem uma carga positiva no P4 se ligam à molécula DRB1*04:02. Dois peptídeos de Dsg3 atendem estes critérios e foram capazes de estimular clones de células T isoladas de pacientes com PV [28, 52]. Linfócitos Th1 e Th2 autorreativos são estimulados e regulam a produção de anticorpos patogênicos por células B, uma vez que o soro de pacientes com PV contém autoanticorpos IgG1 e IgG4 contra Dsg3 [73, 76] levando, assim, a lesar os desmossomos e a manifestação clínica clássica da doença mediante a perda de aderência intercelular [2]. Schmidt et al. [89], estabeleceram um modelo com cobaias para elucidar a associação entre os pacientes com diagnóstico de PV que possuíam alelos distintos de HLA classe II e o papel das células T autorreativas em sua patogênese. Estas cobaias eram transgênicas com HLA-DRB1*04:02 e HLA-DQB1*03:02, que reproduziam, assim, as células T e B que respondem contra a Dsg3. Com este modelo, foi demonstrado que há um desbalanço entre as células patogênicas Th2 reativas a Dsg3 e células T reguladoras anti-inflamatórias. As células Treg exercem seus efeitos inibitórios à doença graças à liberação de interleucinas, TGF- β e contato célula a célula. Em razão dessa capacidade anti-inflamatória, as células Tregs contribuem para a manutenção da autotolerância periférica, que está diminuída em pacientes com PV. Este entendimento permite vislumbrar a possibilidade de tratamentos potenciais futuros mediante o estímulo das células Treg com o objetivo de diminuir a resposta da célula T à Dsg3 e, por consequência, o decréscimo na produção de IgG anti-Dsg3 [76, 89].

A associação do PV ao HLA DRB1*04:02 e ao DQB1*05:03, apesar de ser muito forte, mantém questões adicionais como o porquê da vasta maioria dos pacientes que carregam os alelos de HLA que conferem susceptibilidade ao PV, não desenvolvem a doença. Além disso, os mecanismos moleculares que resultam em transições de períodos de atividade e remissão da doença ainda não estão elucidados, mas, provavelmente, envolvem fatores ambientais ou gatilhos infecciosos, além de fatores genéticos e desregulação imune ^[15].

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Na amostra estudada, de pacientes e controles provenientes da cidade de São Paulo, situada na região do Sudeste do Brasil, verificou-se que os alelos B*57, C*15, DRB1*04, DRB1*08, DRB1*14, DQA1*03:01, DQB1*03:02, DQB1*05:03, bem como os haplótipos HLA-DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 e DRB1*14-DQA1*01:01-DQB1*05:03 estão associados ao pênfigo vulgar.

A associação entre todos os alelos de classe II DR e DQ encontrados no presente estudo já está bem estabelecida na literatura mundial, e os alelos DRB1*04:02 e DQB1*05:03 são os mais prevalentes quando relacionados ao PV. Seus respectivos haplótipos são verificados em virtude do forte desequilíbrio de ligação encontrado entre os alelos DR e DQ.

Pela primeira vez foi verificada a associação entre o alelo B*57 e o PV. Pode-se confirmar que a associação entre o HLA-DRB1*08 é causada por este alelo e não a nenhum outro com o qual esteja em desequilíbrio de ligação.

ANEXOS

ANEXO A

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O desequilíbrio de ligação (DL) ^[80] refere-se à associação não randômica entre alelos de *locus* adjacentes, uma vez que fragmentos do genoma tendem a ser herdados em conjunto por causa dessa proximidade. O padrão de DL no genoma humano varia de acordo com as regiões e populações. Ao relacionar um polimorfismo a uma doença existe a possibilidade de que haja um desequilíbrio de ligação (DL) com um polimorfismo que, este sim, se relacione com o desfecho. Desta forma, em situações de desequilíbrio de ligação a frequência de alelos que tenham proximidade genômica não seguirá a probabilidade comum e, dependendo de sua localização, a presença de um alelo A pode implicar na presença de um alelo B em 99,99% das vezes ^[2].

ANEXO B

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

DADOS DEMOGRÁFICOS		
Paciente Número:		Registro HC:
Data de nascimento: / /	Data da avaliação: / /	Sexo: <input type="checkbox"/> 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino
Cor: <input type="checkbox"/> 1. Branco <input type="checkbox"/> 2. Negro <input type="checkbox"/> 3. Pardo <input type="checkbox"/> 4. Oriental <input type="checkbox"/> 5. Índio		

SINTOMATOLOGIA ORL		
Início dos sintomas:		
Obstrução nasal	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim
Crostas nasais	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim
Epistaxe	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim
Rinorréia com raías de sangue	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim
Disfagia:	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim
Odinofagia:	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim
Sensação de CE / Globus faríngeo:	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim
Disfonia:	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim
Em remissão?	<input type="checkbox"/> 0. Não	<input type="checkbox"/> 1. Sim

ENVOLVIMENTO DO PÊNFIGO		
Pele:	<input type="checkbox"/> 0. Sem história de lesões	<input type="checkbox"/> 1. Com lesões ativas ou passadas
Conjuntiva	<input type="checkbox"/> 0. Sem história de lesões	<input type="checkbox"/> 1. Com lesões ativas ou passadas
Genitais	<input type="checkbox"/> 0. Sem história de lesões	<input type="checkbox"/> 1. Com lesões ativas ou passadas

ACHADOS À OROSCOPIA		
<input type="checkbox"/> 0. Sem história de lesões <input type="checkbox"/> 1. Com lesões ativas ou passadas		

ACHADOS À NASOFIBROLARINGOSCOPIA		
Cavidade nasal e rinofaringe:	<input type="checkbox"/> 0. Sem história de lesões	<input type="checkbox"/> 1. Com lesões ativas ou passadas
Hipofaringe:	<input type="checkbox"/> 0. Sem história de lesões	<input type="checkbox"/> 1. Com lesões ativas ou passadas
Laringe:	<input type="checkbox"/> 0. Sem história de lesões	<input type="checkbox"/> 1. Com lesões ativas ou passadas
Exame não realizado	<input type="checkbox"/>	

EXAMES			
Imunofluorescência direta para C3	<input type="checkbox"/> 0. Ausente	<input type="checkbox"/> 1. Presente	<input type="checkbox"/> 9. Não realizada
Imunofluorescência direta para IgG	<input type="checkbox"/> 0. Ausente	<input type="checkbox"/> 1. Presente	<input type="checkbox"/> 9. Não realizada
Imunofluorescência indireta	<input type="checkbox"/> 0. Ausente	<input type="checkbox"/> 1. Presente título 1/	<input type="checkbox"/> 9. Não realizada
Antidesmogleína 1	<input type="checkbox"/> 0. Ausente	<input type="checkbox"/> 1. Presente	<input type="checkbox"/> 9. Não realizada
Antidesmogleína 3	<input type="checkbox"/> 0. Ausente	<input type="checkbox"/> 1. Presente	<input type="checkbox"/> 9. Não realizada

Data Coleta de Sangue:

TIPIFICAÇÃO DO HLA	
HLA A:	
HLA B:	
HLA DR:	

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

1. Black M, Mignogna MD, Scully C. *Number II. Pemphigus Vulgaris*. Oral Dis. 2005;11(3):119-30.
2. Weber R, Monteiro F, Preuhs-Filho G, Rodrigues H, Kalil J, Miziara ID. *HLA-DRB1*04:02, DRB1*08:04 and DRB1*14 alleles associated to pemphigus vulgaris in southeastern Brazilian population*. Tissue Antigens. 2011;78(2):92-3.
3. Mahmoud A, Miziara ID, Costa KC, Santi CG, Maruta CW, Aoki V. *Laryngeal involvement in pemphigus vulgaris: a proposed classification*. J Laryngol Otol. 2012;126(10):1041-4.
4. Weinberg MA, Insler MS, Campen RB. *Mucocutaneous features of autoimmune blistering diseases*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;84(5):517-34.
5. Scully C, Paes De Almeida O, Porter SR, Gilkes JJ. *Pemphigus vulgaris: the manifestations and long-term management of 55 patients with oral lesions*. Br J Dermatol, 1999;140(1):84-9.
6. Gazit E, Loewenthal R. *The immunogenetics of pemphigus vulgaris*. Autoimmun Rev. 2005;4(1):16-20.
7. Tsankov N, Vassileva S, Kamarashev J, Kazandjieva J, Kuzeva V. *Epidemiology of pemphigus in Sofia, Bulgaria. A 16-year retrospective study (1980-1995)*. Int J Dermatol. 2000;39(2):104-8.
8. Tallab T, Joharji H, Bahamdan K, Karkashan E, Mourad M, Ibrahim K. *The incidence of pemphigus in the southern region of Saudi Arabia*. Int J Dermatol, 2001;40(9):570-2.

¹ Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

9. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Bröcker EB, Zilikens D. *Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans.* J Eur Acad Dermatol Venereol. 2002;16(1):68-71.
10. Pisanti S, Sharav Y, Kaufman E, Posner LN. *Pemphigus Vulgaris: incidence in Jews of different ethnic groups according to age, sex and initial lesion.* Oral Surg. 1974;38(3):382-7.
11. Koc CK SN, Akman-Karakas A, Alpsoy E, Yegin O. *Human leukocyte antigens class I and class II in patients with pemphigus in southern Turkey.* Int J Dermatol. 2013;52(1):53-8.
12. Ahmed AR, Moy R. *Death in pemphigus.* J Am Acad Dermatol. 1982; 7(2):221-8.
13. Robinson J, Lozada-Nur F, Frieden I. *Oral pemphigus vulgaris: a review of the literature and a report on the management of 12 cases.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;84(4):349-55.
14. Kitajima Y. *150th Anniversary Series: desmosomes and autoimmune disease, perspective of dynamic desmosome remodeling and its impairments in pemphigus.* Cell Commun Adhes. 2014;21(6):269-80.
15. Dey-Rao R, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. *Genome-wide expression analysis suggests unique disease promoting and disease-preventing signatures in Pemphigus vulgaris.* Gene Immun. 2013;14(8):487-499.
16. Scully C, Challacombe SJ. *Pemphigus Vulgaris: Update on Etiopathogenesis, Oral Manifestations and Management.* Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(5):397-408.
17. Amagai M, S.J., *Desmoglein as a Target in Skin Disease and Beyond.* J Invest Dermatol. 2012;132:776-84.
18. Nishikawa T, Hashimoto T, Shimizu H, Ebihara T, Amagai M. *Pemphigus: from immunofluorescence to molecular biology.* J Dermatol Sci. 1996;12(1):1-9.
19. Kalish RS. *Pemphigus vulgaris: the other half of the story.* J Clin Invest. 2000;106(12):1433-5.
20. Anhalt GJ, Diaz LA. *Prospects for autoimmune disease: research advances in pemphigus.* JAMA. 2001;285:652-4.

21. Kowalewski C, Mackiewicz W, Schmitt D, Jabłońska S, Haftek M. *Cell-cell junctions in acantholytic diseases. Junction proteins in nonimmune and autoimmune acantholysis*. Arch Dermatol Res. 2001;293(1-2):1-11.
22. Harfouch E, Daoud S. *Allelic variation in HLA-DRB1* loci in Syrian pemphigus vulgaris patients*. Int J Dermatol. 2014;53(12):1460-3.
23. Tron F, Gilbert D, Mouquet H, Joly P, Drouot L, Makni S. *Genetic factors in pemphigus*. J Autoimmun. 2005;24(4):319-28.
24. Wucherpfennig KW, Yu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW, Ahmed AR, Strominger JL. *Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: Charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris*. Proc Nat Acad Sci U S A. 1995;92(25):11935-9.
25. Klein J, Sato A. *Advances in Immunology: The HLA System (First of Two Parts)*. NEJM. 2000;343(10):702-9.
26. Glorio R, Rodriguez Costa G, Haas R, Gruber M, Fainboim L, Woscoff A. *HLA Haplotypes and class II molecular alleles in Argentinian patients with pemphigus vulgaris*. J Cutan Med Surg. 2002;6(5):422-6.
27. Gonzalez-Escribano MF, Jiménez G, Walter K, Montes M, Perez-Bernal AM, Rodríguez MR, Conejo-Mir JS, Núñez-Roldán A. *Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris*. Tissue Antigens. 1998;52(3):275-8.
28. Loiseau P, Lecleach L, Prost C, Lepage V, Busson M, Bastuji-Garin S, Roujeau JC, Charron D. *HLA Class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus*. J Autoimmun. 2000;15(1):67-73.
29. Delgado JC, Yunis DE, Bozón MV, Salazar M, Deulofeut R, Turbay D, Mehra NK, Pasricha JS, Raval RS, Patel H, Shah BK, Bhol K, Alper CA, Ahmed AR, Yunis EJ. *MHC class II alleles and haplotype in patients with pemphigus vulgaris from India*. Tissue Antigens. 1996;48(6):668-72.
30. Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Yunis JJ, Delgado JC, Yunis DE, Firooz A, Dowlati Y, Bahar K, Gregersen PK, Ahmed AR. *Identical MHC markers in non-Jewish Iranian and Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris: possible common central Asian ancestral origin*. Hum Immunol. 1997;57(1):62-7.

31. Lombardi ML, Mercurio O, Tecame G, Fusco C, Ruocco V, Salerno A, Pirozzi G, Manzo C. *Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris*. Tissue Antigens. 1996;47(3):228-30.
32. Lombardi ML, Mercurio O, Ruocco V, Lo Schiavo A, Lombardi V, Guerrera V, Pirozzi G, Manzo C. *Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients*. J Invest Dermatol. 1999;113(1):107-10.
33. Miyagawa S, Higashimine I, Iida T, Yamashina Y, Fukumoto T, Shirai T. *HLA-DRB1*04 and DRB1*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese*. J Invest Dermatol. 1997;109(5):615-8.
34. Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T, Nishikawa T, Shirai T, Inoko H. *HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus*. Tissue Antigens. 1999;54(4):333-40.
35. Miyagawa S, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T. *Genotyping for HLA-A, B and C alleles in Japanese patients with pemphigus: prevalence of Asian alleles of the HLA-B15 family*. Br J Dermatol. 2002;146(1):52-8.
36. Yamashina Y, Miyagawa S, Kawatsu T, Iida T, Higashimine I, Shirai T, Kaneshige T. *Polymorphisms of HLA class II genes in Japanese patients with pemphigus vulgaris*. Tissue Antigens. 1998;52(1):74-7.
37. Niizeki H, Inoko H, Mizuki N, Inamoto N, Watababe K, Hashimoto T, Nishikawa T. *HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 genotyping in Japanese pemphigus vulgaris patients by the PCR-RFLP method*. Tissue Antigens. 1994;44(4):248-51.
38. Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z, Alper CA. *Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris*. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87(19):7658-62.
39. Vega-Memije ME, Sáez de Ocariz-Gutierrez MM, Cortés-Franco R, Moninguez-Soto L, Granados-Arriola J. *Análisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo*. Gac Med Mex. 2001;137(6):535-40.
40. Scharf SJ, Friedmann A, Brautbar C, Szafer F, Steinman L, Horn G, Gyllensten U, Erlich HA. *HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(10):3504-8.

41. Scharf SJ, Freidmann A, Steinman L, Brautbar C, Erlich HA. *Specific HLA-DQB and HLA-DRB1 alleles confer susceptibility to pemphigus vulgaris*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(16):6215-9.
42. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. *Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(11):5056-60.
43. Lee E, Lendas KA, Chow S, Pirani Y, Gordon D, Dionisio R, Nguyen D, Spizuoco A, Fotino M, Zhang Y, Sinha AA. *Disease relevant HLA Class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with Pemphigus Vulgaris*. Hum Immunol. 2006;67(1-2):125-39.
44. Delgado JC, Hameed A, Yunis JJ, Bhol K, Rojas AI, Rehman SB, Khan AA, Ahmad M, Alper CA, Ahmed AR, Yunis EJ. *Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients*. Hum Immunol. 1997;57(2):110-9.
45. Carcassi C, Cottoni F, Floris L, Vacca A, Mulargia M, Arras M, Boero R, La Nasa G, Ledda A, Pizzati A, Cerimele D, Contu L. *HLA haplotypes and class II molecular alleles in Sardinian and Italian patients with pemphigus vulgaris*. Tissue Antigens. 1996;48(6):662-7.
46. Birol A, Anadolu RY, Tutkak H, Gürgey E. *HLA-class 1 and class 2 antigens in Turkish patients with pemphigus*. Int Soc Dermatol. 2002;41(2):79-83.
47. Sáenz-Cantele AM, Fernandez-Mestre M, Montagnani S, Calebotta A, Balbas O, Lacrisse Z. *HLA-DRB1*0402 haplotypes without DQB1*0302 in Venezuelan patients with pemphigus vulgaris*. Tissue Antigens. 2007; 69(4):318-25.
48. Orouji E, Tavakkol AJ, Schmieder A, Layegh P. *HLA-DQB1 gene and pemphigus vulgaris in patients with Mid-East origin*. J Dermatol Sci. 2014;76(2):153-5.
49. Párnická Z, Švecová D, Javor J, Shawkatová I, Buc M. *High Susceptibility to pemphigus vulgaris due to HLA-DRB1*14:54 in the Slovak population*. International Journal of Immunogenetics. 2013;40(6):471-5.
50. Shoimer I, Kalia S, Gladman D, Pellet F, Mydlarski R. *HLA associations in patients with pemphigus vulgaris: A Canadian perspective*. J Am Acad Dermatol. 2015;72(5 S1):AB30.

51. Orouji E, Tavakkol AJ, Schmieder A, Layegh P. *HLA-DQB1 gene and pemphigus vulgaris in patients with Mid-East origin*. J Dermatol Sci. 2014;76(2):11.
52. Yan L, Wang JM, Zeng K. *Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis*. Br J Dermatol. 2012;167(4):768-77.
53. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD. *Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites*. Hum Hered. 2006;62(4):190-5.
54. Scully C, Bagan JV, Black M, Carrozzo M, Eisen D, Escudier M, Farthing P, Kuffer R, Lo Muzio L, Mignogna M, Porter SR. *Epithelial biology*. Oral Dis. 2005;11(2):58-71.
55. Waschke J. *The desmosome and pemphigus*. Histochem Cell Biol. 2008;130(1):21-54
56. Green KJ, Gaudry CA. *Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments?* Nat Rev Mol Cell Biol. 2000;1(3):208-16.
57. Hietanen J, Salo OP. *Pemphigus: an epidemiological study of patients treated in Finnish hospitals between 1969 e 1978*. Acta Derm Venereol. 1982;62(6):491-6.
58. Micali G, Musumeci ML, Nasca MR. *Epidemiologic analysis and clinical course of 84 consecutive cases of pemphigus in eastern Sicily*. Int J Dermatol. 1998;37(3):197-200.
59. Uzun S, Durdu M, Akman A, Gunasti S, Uslular C, Memisoglu HR, Alpsoy E. *Pemphigus in the Mediterranean region of Turkey: a study of 148 cases*. Int J Dermatol. 2006;45(5):523-8.
60. V'ickova-Laskoska MT, Laskoski DS, Kamberova S, Caca-Bilja ovska N, Volckova N. *Epidemiology of pemphigus in Macedonia: A 15-year retrospective study (1990-2004)*. Int J Dermatol. 2007;46(3):253-8.
61. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. *Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris - incidence and mortality in the UK: population based cohort study*. BMJ, 2008;337:a180.

62. Michailidou EZ, Belazi MA, Markopoulos AK, Tsatsos MI, Mourellou ON, Antoniadou DZ. *Epidemiologic survey of pemphigus vulgaris with oral manifestations in northern Greece: Retrospective study of 129 patients*. Int J Dermatol. 2007;46(4):356-61.
63. Korman N. *Pemphigus*. J Am Acad Dermatol. 1988;18(6):1219-38.
64. Ariyawardana A, Tilakaratne WM, Dissanayake M, Vitanaarachchi N, Basnayake LK, Sitheequa MA, Ranasinghe AW. *Oral pemphigus vulgaris in children and adolescents: a review of the literature and a case report*. Int J Paediatr Dent. 2005;15(4):287-93.
65. Miziara ID, Ximenes Filho JA, Ribeiro FC, Brandão AL. *Acometimento oral no pênfigo vulgar*. Rev Bras Otorrinolaringol. 2003;69(3):327-31.
66. Hale EK, Bystryn JC. *Laryngeal and nasal involvement in pemphigus vulgaris*. J Am Acad Dermatol. 2001;44:609-11.
67. Davenport S, Chen SY, Miller AS. *Pemphigus vulgaris: clinicopathologic review of 33 cases in the oral cavity*. Int J Periodontics Restorative Dent. 2001;21:85-90.
68. Scully C, Porter SR. *The clinical spectrum of desquamative gingivitis*. Semin Cutan Med Surg. 1997;16:308-13.
69. Mignoma MD, Fortuna G, Leuci S, Ruoppo E, Marasca F, Matarasso S. *Nikolsky's sign on the gingival mucosa: A clinical tool for oral health practitioners*. J Periodontol. 2008;79(12):2241-6.
70. Mihai S, Sitaru C. *Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases*. J Cell Mol Med. 2007;11(3):462-81.
71. Pulkkinen L, Choi YW, Simpson A, Montagutelli X, Sundberg J, Uitto J, Mahoney MG. *Loss of cell adhesion in Dsg3bal-Pas mice with homozygous deletion mutation (2079del14) in the desmoglein 3 gene*. J Invest Dermatol. 2002;119(6):1237-43.
72. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. *Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic*. J Clin Invest. 1992;90(3):919-26.
73. Amber KT, Staropoli P, Shiman MI, Elgart GW, Hertl M. *Autoreactive T cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris*. Exp Dermatol. 2013;22(11):699-704.

74. Hertl M, Riechers R. *Analysis of the T cells that are potentially involved in autoantibody production in pemphigus vulgaris*. J Dermatol. 1999;26:748-52.
75. Nishifuji, K., Amagai M, Kuwana M, Iwasaki T, Nishikawa T. *Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production*. J Invest Dermatol. 2000;114(1):88-94.
76. Hertl M, Eming RD, Veldman C. *T cell control in autoimmune bullous skin disorders*. J Clin Invest. 2006;116(5):1159-66.
77. Lunardon L, Tsai K, Probert KJ, Fett N, Stanley JR, Werth VP, Tsai DE, Payne AS, *Adjuvant rituximab therapy of pemphigus: a single center experience with 31 patients*. Arch Dermatol. 2012;148(9):1031-6.
78. Salathiel AM, Brochado MJ, Kim O, Deghaide NHS, Donadi EA, Roselino AM. *Family study of monozygotic twins affected by pemphigus vulgaris*. Human Immunol. 2016. (ahead of print).
79. Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC, Donadi EA. *Como entender a associação entre o sistema HLA e as Doenças Auto-ímmunes endócrinas*. Arq Bras Endocrinol Metab. 2003;47(5):601-11.
80. Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, Thompson J, Infante-Rivard C, Guyatt G. *How to use an article about genetic association: A: background concepts*. JAMA. 2009;301(1):74-81.
81. Ribeiro D. *O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil*. 2ª ed. 1995, São Paulo: Companhia das Letras. 470.
82. Klein HS. *As origens africanas dos escravos brasileiros*. In: *Homo brasilis*, S.D.J. Pena, Editor. 2002, FUNPEC: Ribeirão Preto. p. 196.
83. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Pesquisa nacional por amostra de domicílios - Síntese de Indicadores 2003: Notas técnicas*. 2004.
84. Camisa C, Helm TN. *Paraneoplastic pemphigus is a distinct neoplasia-induced autoimmune disease*. Arch Dermatol. 1993;129:883-6.
85. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. *Single Human Leukocyte Antigen flow cytometry beads for accurate identification of Human Leukocyte Antigen antibody specificities*. Transplantation. 2003;75(1):43-9.

86. Cesbron-Gautier A, Simon P, Achard L, Cury S, Follea G, Bignon JD. *Technologie Luminex: application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps anti-HLA*. Ann Biol Clin. 2004;62():93-8.
87. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, et al. *Nomenclature for Factors of the HLA System, 2004*. Hum Immunol. 2005;66(5):571-636.
88. NMDP. *HLA Resources: Allele Code List in Alphabetical Order*. 2008 [cited 2010 08.01.2010]; Available from: http://bioinformatics.nmdp.org/HLA/Allele_Codes/Allele_Code_Lists/Alphabetical_Order/index.html.
89. Schmidt T, Willenborg S, Hunig T, Deeg CA, Sonderstup G, Hertl M, Eming R. *Induction of T regulatory cells by the superagonistic anti-CD28 antibody D665 leads to decreased pathogenic IgG autoantibodies against desmoglein 3 in a HLA-transgenic mouse model of pemphigus vulgaris*. Exp Dermatol. 2015;25(4):293-8.
90. Cardon LR, Palmer LJ. *Population stratification and spurious allelic association*. Lancet. 2003;361(9357):598-604.
91. Whitacre CC. *Sex differences in autoimmune disease*. Nature Publishing Group, Nat Immunol. 2001;2(9):777-80.
92. Slomov E, Loewenthal R, Goldberg I, Korostishevsky M, Brenner S, Gazit E, *Pemphigus Vulgaris in Jewish Patientes is Associated With HLA-A Region Genes: Mapping by Microsatellite Markers*. Hum Immunol. 2003;64(8):771-9.
93. Brochado MJ, Nascimento DF, Campos W, Deghaide NH, Donadi EA, Roselino AM. *Differential HLA class I and class II associations in pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris of patients from a prevalent Southeastern Brazilian region*. J Autoimmun. 2016;72:19-24.
94. Mortazavi H, Amirzargar AA, Esmaili N, Toofan H, Ehsani AH, Housseini SH, Rezaei N, *Association of human leukocyte antigen class I antigens in Iranian patients with pemphigus vulgaris*. J Dermatol. 2013;40(4):244-8.
95. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. *New allele frequency database*: <http://www.allelefreqencies.net>. Tissue Antigens. 2003;61(5):403-7.

96. Pablo R, García-Pacheco JM, Vilches C, Moreno ME, Sanz L, Rementería MC, Puente S, Kreisler M. *HLA class I and class II allele distribution in the Bubi population from the island of Bioko (Equatorial Guinea)*. *Tissue Antigens*. 1997;50(6):593-601.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DIRETORIA CLÍNICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA - CAPPesq
CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)	
Nº do Protocolo:	Tipo: Humanos
Instituto: ICHC	
Registro on-line nº: 8961	Data de Entrada: 10/02/2012

Este projeto envolve:

Pacientes HC	Sim
Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa)	Não
Documentos HC(Prontuários e Outros)	Sim
Materiais estocados no HC	Não
Peças anatômicas de cadáveres	Não

Título do Protocolo de Pesquisa

Estudo da associação entre antígenos de HLA – DR e DQ - e pênfigo vulgar em pacientes brasileiros.
--

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

Pênfigo vulgar; Antígenos HLA; Antígenos HLA-A; Antígenos HLA-B; Antígenos HLA-DR; Antígenos HLA-DQ; Genes Classe I do Complexo de Histocompatibilidade (MHC); Genes Classe II do Complexo de Histocompatibilidade (MHC).

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

Pênfigo Vulgar está associado a diversos alelos em diferentes populações, principalmente HLA-DRB1*04:02 e HLA-DQB1*05:03. Entretanto, estes alelos não estão sempre presentes em pacientes com PV. Em estudo preliminar, foi investigada a possível correlação entre os alelos HLA-DR e Pênfigo Vulgar pela tipagem de um grupo de 36 pacientes e 162 controles sadios de uma população brasileira altamente miscigenada. Foi observada uma frequência significativamente aumentada dos alelos HLA DRB1*04:02, DRB1*08:04 e DRB1*14 nos pacientes em comparação com o grupo controle (47.2% vs. 1.2%; 36.1% vs. 4.3%; 27.8% vs. 7.4%, respectivamente). Este trabalho descreveu pela primeira vez uma forte associação entre o alelo DRB1*08:04 e pênfigo vulgar na população brasileira. O resultado levantou a suspeita de que o alelo DRB1*08:04 está envolvido com a doença. O presente estudo tem com objetivo a tipagem de alta resolução dos loci DQA1 e DQB1 no DNA extraído previamente para diferenciar se a associação é inerente ao alelo ou ao haplótipo específico, além de aumentar o número de casos em cinquenta e seis pacientes, tipando os alelos DR e DQ em todos eles.

4. Pesquisador Responsável:

Prof. Dr. Ivan Dieb Miziara

<http://lattes.cnpq.br/3120760745952876>

Graduação: 01/1986

Vínculo: HC

5. Pesquisador Executante:

Julio Miranda Gil

<http://lattes.cnpq.br/2764991941079574>

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Dr. Raimar Weber

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Oftalmologia e Otorrinolaringologia

Disciplina: Otorrinolaringologia

LIM: LIM/32 - Lab de Otorrinolaringologia

8. Existe entidade externa envolvida?

Não

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Sim

Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Doutorado

13. Investigação

Retrospectiva e Prospectiva (Ambos)

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Entrevistas e questionários

Prontuários de pacientes

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Clinica

16. Áreas temáticas previstas na Res. 196/96

Nenhuma das alternativas

17. Patrocínio

Não há patrocínio

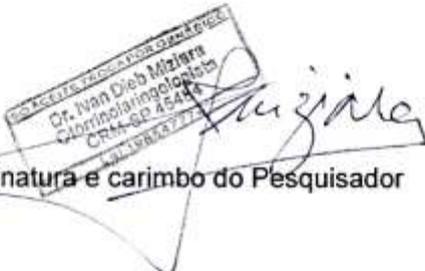
18. Valor do financiamento

0,00

19. Cronograma de execução da pesquisa

Prazo: 12 meses

20. Assinaturas


Assinatura e carimbo do Pesquisador

Aprovado em 24, 04, 2012


Assinatura e carimbo da Chefia
com data de aprovação
pelo Conselho do Departamento

Aprovado em 24, 04, 2012

Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento
Chefe do Departamento de
Oftalmologia e Otorrinolaringologia da
Universidade de São Paulo

APÊNDICE 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F

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

ENDEREÇO: Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA. Estudo da correlação entre antígenos de histocompatibilidade (HLA) dR e dQ e Pênfigo Vulgar.

PESQUISADOR: Ivan Dieb Miziara

CARGO/FUNÇÃO: Médico Chefe do Ambulatório de Estomatologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45484

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica de Otorrinolaringologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 18 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa.

Para ter certeza que você não tem outras doenças terá que realizar exame de sangue, para isso haverá a necessidade de tirar um pouco do seu sangue.

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

Será feita a retirada de uma pequena quantidade de sangue. Com este sangue serão feitos os exames para saber o que causou as feridas.

3. Desconfortos e riscos esperados.

Haverá o pequeno desconforto da picada da agulha necessária para retirada de sangue.

4. Benefícios que poderão ser obtidos.

Como benefício você irá ajudar a identificar a Possível causa das feridas.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Nenhum

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

Durante todo tratamento você terá acesso, a qualquer tempo, para observar a ficha onde ficarão guardadas todas as suas informações e terá liberdade para fazer perguntas para esclarecer qualquer dúvida.

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo a continuidade da assistência.

O tratamento não depende de sua participação no estudo. Você tem a liberdade de deixar de participar do estudo a qualquer momento e retirar o seu consentimento sem que isto prejudique ou altere o seu tratamento.

3. Salvaguarda de confidencialidade, sigilo e privacidade.

Em nenhum momento durante o tratamento e na publicação do resultado desse estudo você terá seu nome exposto, estando assim sua participação neste estudo em segredo

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Você terá assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP para qualquer dano que por acaso venha ocorrer à sua saúde decorrente deste estudo.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Nenhum.

V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Julio Miranda Gil – Rua Afonso Brás, 864 cj. 32 Tel. 3044.2087

VI - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII – CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20.....

Assinatura do sujeito da pesquisa
ou representante legal

Julio Miranda Gil
pesquisador

APENDICE 3

APROVAÇÃO PLATAFORMA BRASIL

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
1. Projeto de Pesquisa: Estudo da associação entre antígenos de HLA - Dr e Dq - e pênfigo vulgar em pacientes brasileiros		2. CAQE:	
3. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
4. Nome: Ivan Deb Mizara			
5. CPF: 004.500.815-45		6. Endereço (Rua, n.º): Rua Capote Valente, 127-11 Pinheiros null SAO PAULO SAO PAULO 05428000	
7. Nacionalidade: BRASILEIRA		8. Telefone: (11) 3065-7962	9. Outro Telefone:
10. Email: ivan.mizara@gmail.com			
11. Cargo:			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>09, 04, 12</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP		13. CNPJ: 00.448.040/0001-22	14. Unidade/Órgão:
15. Telefone: (11) 3069-6442		16. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>ELOISA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFÁ</u>		CNPJ: <u>042.658.925-92</u>	
Cargo/Função: <u>Diretora Clínica do HCFMUSP</u>			
Data: <u>07, 05, 12</u>		 Assinatura PROFESSORA ELOISA BONFÁ Diretora Clínica do HCFMUSP	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			


 Prof. Dr. Ricardo Jorge de Souza
 Chefe do Departamento de
 Dermatologia e Otorrinolaringologia da
 Universidade de São Paulo

APÊNDICE 4

APROVAÇÃO FAPESP

Histórico	
Processo	<u>2013/23678-2</u>
Linha de Fomento	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular - Fluxo Contínuo
Situação	Em Execução
Vigência	01/08/2014 a 31/07/2015
Beneficiário	<u>Ivan Dieb Miziara</u>  
Responsável	<u>Ivan Dieb Miziara</u>
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Medicina/FM/USP
Área de Alocação de Recursos	Saúde

Descrição	Data do Evento
Assinatura da FAPESP Registrada - Contrato Inicial	25/08/2014
Assinatura do Outorgado Registrada - Contrato Inicial	25/08/2014
Análise da Minuta Concluída - Contrato Inicial	08/07/2014
Preparação da Minuta Concluída - Contrato Inicial	03/07/2014
Verificação da habilitação com resultado "Habilitado" - Contrato Inicial	03/07/2014
Aceite da Concessão com resultado "Aprovado"	29/06/2014
Resultado de Despacho Científico Divulgado - Reconsideração	27/06/2014
Emissão de Despacho Científico Concluída - Reconsideração	27/06/2014
Preparação de Despacho Científico Concluída - Reconsideração	27/06/2014
Pré-Preparação de Despacho Científico Concluída - Reconsideração	25/06/2014
Despacho Científico Iniciado - Reconsideração	25/06/2014
Recomendação da Coordenação Adjunta Concluída - Reconsideração	23/06/2014
Recomendação da Coordenação de Área/Programa Concluída - Reconsideração	23/06/2014
Indicação de Assessor ad-hoc Concluída - Reconsideração	23/06/2014
Indicação de Assessor ad-hoc Removida - Reconsideração	23/06/2014
Indicação de Assessor ad-hoc Concluída - Reconsideração	23/06/2014
Habilitação Concluída - Reconsideração	23/05/2014
Habilitação Iniciada - Reconsideração	23/05/2014
Submissão da Solicitação - Reconsideração	19/05/2014
Resultado de Despacho Científico Divulgado - Proposta Inicial	05/05/2014
Emissão de Despacho Científico Concluída - Proposta Inicial	05/05/2014
Preparação de Despacho Científico Concluída - Proposta Inicial	05/05/2014
Recomendação da Coordenação Adjunta Concluída - Proposta Inicial	02/05/2014
Revisão da Recomendação da Coordenação Adjunta - Proposta Inicial	16/04/2014
Pré-Preparação de Despacho Científico Concluída - Proposta Inicial	15/04/2014
Despacho Científico Iniciado - Proposta Inicial	15/04/2014
Recomendação da Coordenação Adjunta Concluída - Proposta Inicial	14/04/2014
Recomendação da Coordenação de Área/Programa Concluída - Proposta Inicial	14/04/2014
Parecer de Assessor ad-hoc Emitido - Proposta Inicial	13/04/2014
Solicitação enviada a Assessor ad-hoc para emissão de parecer - Proposta Inicial	25/03/2014
Indicação de Assessor ad-hoc Concluída - Proposta Inicial	24/03/2014
Indicação de Assessor ad-hoc Cancelada - Proposta Inicial	13/02/2014
Solicitação enviada a Assessor ad-hoc para emissão de parecer - Proposta Inicial	12/02/2014
Revisão da Indicação de Assessor ad-hoc Concluída - Proposta Inicial	10/02/2014
Indicação de Assessor ad-hoc Concluída - Proposta Inicial	10/02/2014
Habilitação Concluída - Proposta Inicial	18/11/2013
Habilitação Iniciada - Proposta Inicial	18/11/2013
Submissão da Solicitação - Proposta Inicial	15/11/2013