

BRUNO ZAGONEL PIOVEZAN

SUSCEPTIBILIDADE AO PÊNFIGO FOLIÁCEO E O POLIMORFISMO DE
GENES DA FAMÍLIA NLR

CURITIBA

2011

BRUNO ZAGONEL PIOVEZAN

SUSCEPTIBILIDADE AO PÊNFIGO FOLIÁCEO E O POLIMORFISMO DE
GENES DA FAMÍLIA NLR

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do Título de Mestre em Genética

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Luiza Petzl-Erler.

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná

Sistema de Bibliotecas

Piovezan, Bruno Zagonel

Susceptibilidade ao pênfigo foliáceo e o polimorfismo de genes da família NLR. / Bruno Zagonel Piovezan. – Curitiba, 2011.

107 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Maria Luiza Petzel-Erler

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética 2. Pênfigo I. Título II. Petzel-Erler, Maria Luiza III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

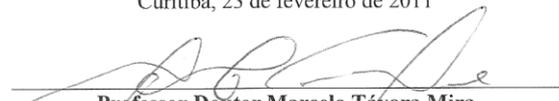


PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **BRUNO ZAGONEL PIOVEZAN** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2011



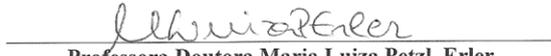
Professor Doutor Marcelo Távora Mira
PUC-PR - Membro Titular



Professora Doutora Danielle Malheiros Ferreira
Universidade Positivo - Membro Titular



Professora Doutora Lupe Furtado Alle
UFPR - Membro Titular



Professora Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Visto:



Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coodenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil
Tel (+41) 33611587 / 33611684 - Fax (+41) 33611793 - e-mail ppg-gen@ufpr.br

RESUMO

A família gênica NLR codifica uma série de proteínas intracelulares solúveis caracterizadas pela presença de um domínio de ligação a nucleotídeos e um domínio rico em repetições de leucina, sendo sua principal função a modulação do sistema imune. O pênfigo foliáceo é uma doença autoimune da epiderme em que estão presentes autoanticorpos patogênicos contra a desmogleína 1, uma importante proteína de adesão celular, que levam a formação de bolhas epidérmicas e o desprendimento das camadas superficiais da pele. Nesse estudo investigamos a relação entre o polimorfismo de quatro genes NLR e o pênfigo foliáceo, sendo eles *NLRP1* e *NLRP3*, que estão envolvidos na formação dos inflamassomos; *NLRP12*, que participa da regulação de NF- κ B; e *CIITA*, um importante fator de transcrição de MHC de classe II. Para isso contamos com uma amostra constituída por 251 pacientes de pênfigo foliáceo e 209 controles livres da doença. Dos oito polimorfismos analisados, o SNP rs3087456, localizado no promotor do gene *CIITA*, apresentou associação significativa com a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo (OR=1.66, $p=10^{-3}$). Essa associação se caracteriza pela maior susceptibilidade de indivíduos portadores do alelo G, tanto em homozigose quanto em heterozigose e aparentemente está relacionada a alterações nos níveis de expressão de *CIITA* e conseqüentemente nos níveis de expressão de MHC de classe II. Esse resultado reforça a importância das moléculas MHC na patogênese do pênfigo foliáceo, além de indicarem um possível envolvimento de *CIITA* em outras doenças autoimunes.

Palavras-chave: Pênfigo foliáceo, NLRP12, NLRP1 NLRP3, CIITA

ABSTRACT

The NLR gene family codes a group of intracellular soluble proteins characterized by the presence of a nucleotide binding domain and a leucine-rich repeat domain. Their main function is immune modulation, acting in various cellular processes. Pemphigus foliaceus is an autoimmune blistering disease in which pathogenic autoantibodies against desmoglein 1, an important cell adhesion protein, causes severe skin lesions. Here we investigated the possible association of the polymorphism of four NLR genes and pemphigus foliaceus disease, namely *NLRP1* and *NLRP3*, which are involved in inflammasome formation; *NLRP12*, that participates of NF- κ B regulation; and *CIITA*, and important MHC class II transcription factor. Eight single nucleotide polymorphisms were analyzed and one (rs3087456, located at *CIITA* promoter) was found associated with pemphigus foliaceus susceptibility. The association is characterized by the higher susceptibility of carriers of allele G (OR=1.66, $p=10^{-3}$), in homozygotes or heterozygotes. Apparently the higher susceptibility to pemphigus foliaceus is a consequence of alterations in *CIITA* levels and, consequently, MHC class II levels. This result reinforces the importance of MHC class II molecules to pemphigus pathogenesis and suggests the involvement of *CIITA* in other autoimmune diseases.

Key-words: Pemphigus foliaceus, NLRP12, NLRP1 NLRP3, CIITA

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO, UMA DOENÇA DA EPIDERME	9
2.2 FORMAS CLÍNICAS DE PÊNFIGO	10
2.3 PATOFISIOLOGIA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO.....	12
2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	19
2.5 EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.6 ETIOLOGIA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO	22
2.7 EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES DE PÊNFIGO FOLIÁCEO.....	25
2.8 A FAMÍLIA GÊNICA NLR.....	26
2.9 NOMENCLATURA DOS GENES NLR	30
2.10 FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS NLR	33
2.11 OS INFLAMASSOMOS.....	35
2.12 CIITA E A EXPRESSÃO DE MHC DE CLASSE II	40
2.13 Os genes NLRP	41
2.14 O GENE <i>NLRP12</i>	43
2.15 DOENÇAS E A FAMÍLIA NLR.....	45
3 HIPÓTESES	47
4 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	48
5 ARTIGO	50
5.1 ABSTRACT	50
5.2 INTRODUCTION.....	51
5.3 SUBJECTS AND METHODS	52
5.3.1 Population samples.....	52
5.3.2 Nucleic acids purification	53

5.3.3 Genotyping	53
5.3.4 NLRP12 expression assay.....	53
5.3.5 Statistical analysis.....	54
5.4 RESULTS	55
5.4.1 Association analyses	55
5.4.2 NLRP12 gene expression	55
5.5 DISCUSSION.....	56
5.6 REFERENCES.....	59
5.7 FIGURES AND TABLES.....	63
5.8 SUPPLEMENTARY TABLES.....	69
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICE	99

1 INTRODUÇÃO

O pênfigo foliáceo é uma doença autoimune da epiderme caracteriza pela presença de autoanticorpos contra uma importante proteína de adesão celular. A autoimunidade se manifesta com a formação de bolhas e o desprendimento da camada superficial da epiderme. No Brasil, onde também é conhecido como “fogo selvagem” devido às sensações de ardor e calor, a doença ocorre de forma endêmica (pênfigo foliáceo endêmico) e acomete principalmente adultos jovens vivendo em áreas rurais. Apesar de ocorrer de forma esporádica em praticamente todo o mundo, o pênfigo foliáceo tem sua maior incidência no Brasil, com algumas regiões apresentando incidência e prevalência da doença em níveis muito superiores aos observados em outras localidades.

Como em outros distúrbios multifatoriais, a manifestação do pênfigo foliáceo depende da interação entre fatores genéticos e ambientais. Apesar das observações epidemiológicas e dos estudos já realizados, o componente genético de susceptibilidade ao pênfigo foliáceo, assim como sua etiologia, não são completamente conhecidos. Entretanto, como observado para outras doenças autoimunes, o desenvolvimento do pênfigo foliáceo depende de vários genes e alelos que tem efeito baixo ou moderado sobre o fenótipo dos indivíduos, sem que nenhum alelo seja suficiente ou indispensável para que a doença ocorra.

A análise de genes candidatos é de grande utilidade para a compreensão do desenvolvimento do pênfigo foliáceo e muitos dos genes associados à doença foram identificados através de estudos de genética epidemiológica. Geralmente essa abordagem envolve genes que são escolhidos com base no conhecimento já existente acerca de sua função, de seu polimorfismo e das informações que se têm sobre a própria doença. Dessa forma, à medida que o conhecimento avança novos genes podem surgir como candidatos, justificando novos estudos e possivelmente revelando um novo aspecto a respeito da etiologia ou patogênese do pênfigo foliáceo.

Recentemente um estudo em que comparou a expressão genica global de linfócitos T CD4⁺ entre diferentes subgrupos de pacientes de pênfigo e

indivíduos livres da doença utilizando a tecnologia de microarranjos de oligonucleotídeos. Varias diferenças foram observadas e os genes identificados como diferencialmente expressos estavam relacionados a diversos processos celulares, tais como adesão e migração de linfócitos, apoptose, proliferação celular e apresentação de antígenos entre outros. Uma constatação interessante foi a de que a região cromossômica 19q13 continha o maior número de genes diferencialmente expressos, sendo considerada uma região que abrigaria genes de susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. Dentre eles está o gene *NLRP12*, um gene pertencente à família gênica NLR e envolvido na modulação da resposta imune, mas ainda pouco explorado no contexto da autoimunidade.

Apesar do conhecimento sobre o gene *NLRP12* ainda ser incipiente, os dados existentes apontam para uma série de funções ligadas ao sistema imunológico. Dentro desse contexto, o presente estudo teve como objetivo explorar possíveis associações entre polimorfismos e expressão do gene *NLRP12* e o pênfigo foliáceo. Porém o estudo não se limitou apenas a esse gene, se estendendo também para outros genes relacionados, também pertencentes à família gênica NLR. Além de *NLRP12*, também foram analisados *NLRP1* e *NLRP3*, assim como *CIITA*, um importante fator de transcrição de genes MHC de classe II.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO, UMA DOENÇA DA EPIDERME

O pênfigo foliáceo se enquadra entre as dermatoses bolhosas, um grupo diverso de doenças que afetam a pele e/ou membranas mucosas. A principal característica dessas afecções é a formação de vesículas e bolhas na epiderme, que podem levar ao aparecimento de lesões mais graves. Essas condições podem ser classificadas de maneira prática em desordens mecânicas, metabólicas, alérgicas e autoimunes. (MUTASIM, 1991). Nas dermatoses bolhosas autoimunes os pacientes desenvolvem autoanticorpos contra diferentes proteínas de adesão celular presentes na epiderme, resultando nas manifestações cutâneas observadas. Trata-se de um grupo de doenças de baixa incidência, mas de morbidade elevada e possivelmente letais. Entre as dermatoses bolhosas autoimunes estão a epidermólise bolhosa adquirida, a dermatite herpetiforme, a dermatose por IgA linear e as diferentes formas de penfigóide e de pênfigo.

Além do pênfigo foliáceo, existem pelo menos mais dois subtipos de pênfigo: pênfigo vulgar e pênfigo paraneoplásico. De forma geral, pênfigo pode ser definido como um conjunto de doenças autoimunes cutâneas ou mucocutâneas caracterizadas por bolhas intraepiteliais e pela produção de autoanticorpos direcionados contra desmogleínas, que são moléculas de adesão celular expressas nos queratinócitos (AMAGAI et al., 1995; DANGL e JONES, 2001).

Os principais subtipos de pênfigo são o pênfigo foliáceo e o pênfigo vulgar. Um dos pontos marcantes que diferencia essas duas formas é o seu autoantígeno: desmogleína 3 no pênfigo vulgar e desmogleína 1 no pênfigo foliáceo. Já o pênfigo paraneoplásico é a forma mais rara de pênfigo, estando invariavelmente associada a neoplasias linfoproliferativas (ANHALT et al., 1990). Nessa forma são observadas lesões bastante polimórficas, que podem assemelhar-se às do pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo, líquen plano, doença do

enxerto contra o hospedeiro, eritema multiforme ou síndrome de Stevens-Johnson. Os autoanticorpos séricos presentes nos pacientes de pênfigo paraneoplásico podem reconhecer múltiplos antígenos localizados no epitélio escamoso estratificado ou no epitélio colunar, tais como desmoplaquina I, desmoplaquina II, envoplaquina, periplaquina, além de desmogleína 1 e desmogleína 3 (AMAGAI et al., 1998; KIYOKAWA et al., 1998; KIM et al., 1997; OURSLER et al., 1992).

2.2 FORMAS CLÍNICAS DE PÊNFIGO

A manifestação do pênfigo foliáceo varia entre pacientes. São observadas duas formas clínicas principais: a forma localizada (ou frustra) e a forma generalizada. Na forma localizada nota-se inicialmente uma lesão cutânea primária. Trata-se de uma bolha superficial contendo um fluído que pode ser límpido ou amarelado. Essa bolha é bastante frágil e se rompe com facilidade, expondo as camadas mais internas da epiderme e deixando uma pequena área erosiva (Figura 1). Geralmente a lesão primária aparece na cabeça ou pescoço e é seguida por outras lesões semelhantes. Essas novas lesões comumente afetam as áreas seboreicas da face e do tronco, preferencialmente em regiões expostas ao sol (Figura 2A). Elas podem permanecer nesse estado por meses ou até anos ou regredir espontaneamente, em alguns casos. Entretanto, em certos pacientes elas se espalham, atingindo todo o tronco e também as extremidades do corpo, categorizando assim a forma generalizada do pênfigo foliáceo (HANS-FILHO et al., 1999) (Figura 2B). Em alguns poucos casos a forma generalizada pode ser fulminante, com o surgimento de muitas lesões num curto espaço de tempo (uma a três semanas) após o aparecimento da lesão primária. Tanto na forma localizada como na forma generalizada não há o envolvimento de mucosas, sendo apenas a pele afetada.

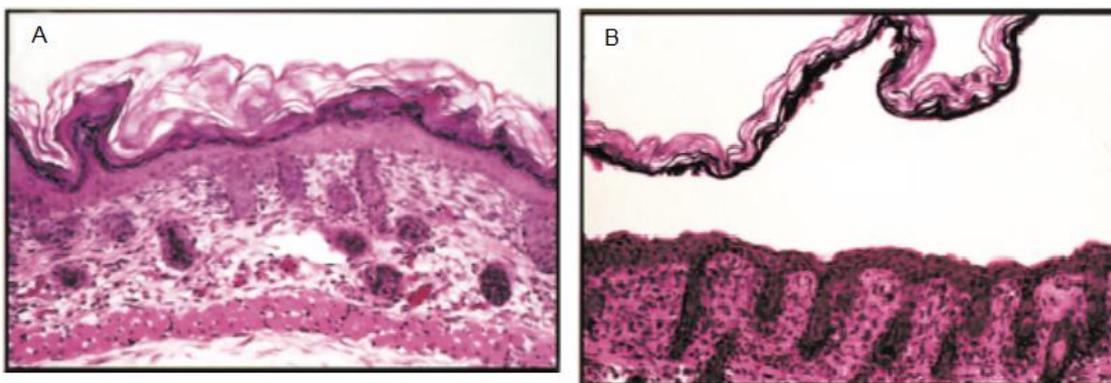


FIGURA 1 - ASPECTO HISTOLÓGICO DA ACANTÓLISE. Epiderme normal, sem bolhas (A) e uma bolha acantolítica (B). Notar o desprendimento da camada subcórnea, dando origem a uma bolha superficial

FONTE: WU et al., 2000. Modificado pelo autor.



FIGURA 2 - LESÕES CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES DE PÊNFIGO FOLIÁCEO. Pacientes com a forma localizada (A) e generalizada (B) do pênfigo foliáceo. As setas indicam lesões pontuais no paciente com a forma localizada da doença
FONTE: MALHEIROS, 2009.

A forma generalizada do pênfigo foliáceo compreende três síndromes clínicas distintas (HANS-FILHO et al., 1999). Na síndrome bolhosa-esfoliativa os pacientes possuem a doença aguda, intensa, com lesões por todo o corpo e bacteremia ou septicemia não são observados. Se expostos ao vírus herpes simplex, esses pacientes podem desenvolver erupções variceliformes de Kaposi, uma condição possivelmente fatal. Em alguns casos febre, artralgia e mal-estar generalizado também são constatados. Numa segunda síndrome clínica, os pacientes apresentam eritoderma esfoliativo típico. São observadas erosões superficiais confluentes, crostosas e exsudato sérico. Finalmente, temos os pacientes que apresentam lesões nodulares e placas ceratóticas

generalizadas. Nesses casos o aspecto das lesões se aproxima ao das lesões crônicas de pacientes com a forma localizada.

2.3 PATOFISIOLOGIA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO

Imunologicamente o pênfigo foliáceo se caracteriza pela presença de autoanticorpos patogênicos com especificidade para a epiderme, sendo estes os responsáveis pelo aparecimento das lesões. Esses autoanticorpos são do isotipo IgG, principalmente da subclasse IgG4, com títulos menores de IgG1, com IgG2 e IgG3 pouco frequentes (SANTOS et al., 2001; TREMEAU-MARTINAGE et al., 1995). Os autoanticorpos IgG4 são patogênicos e direcionados contra desmogleínas, sendo depositados sobre os queratinócitos (MARTEL e JOLY, 2001). As desmogleínas são glicoproteínas transmembrânicas, pertencentes à superfamília das caderinas, que integram uma importante estrutura de adesão celular conhecida como desmossomo (Figura 3). No pênfigo foliáceo o autoantígeno é a desmogleína 1 e a presença de autoanticorpos contra essa molécula está diretamente relacionada com a atividade da doença: altos títulos de IgG4 são observados durante a fase inicial e em períodos de recaída, declinando com a evolução do quadro e sendo ausente apenas na cura. De maneira semelhante, títulos menores de IgG1 também são observados nas fases mais iniciais, sendo reduzidos conforme a evolução da doença (SANTOS et al., 2001).

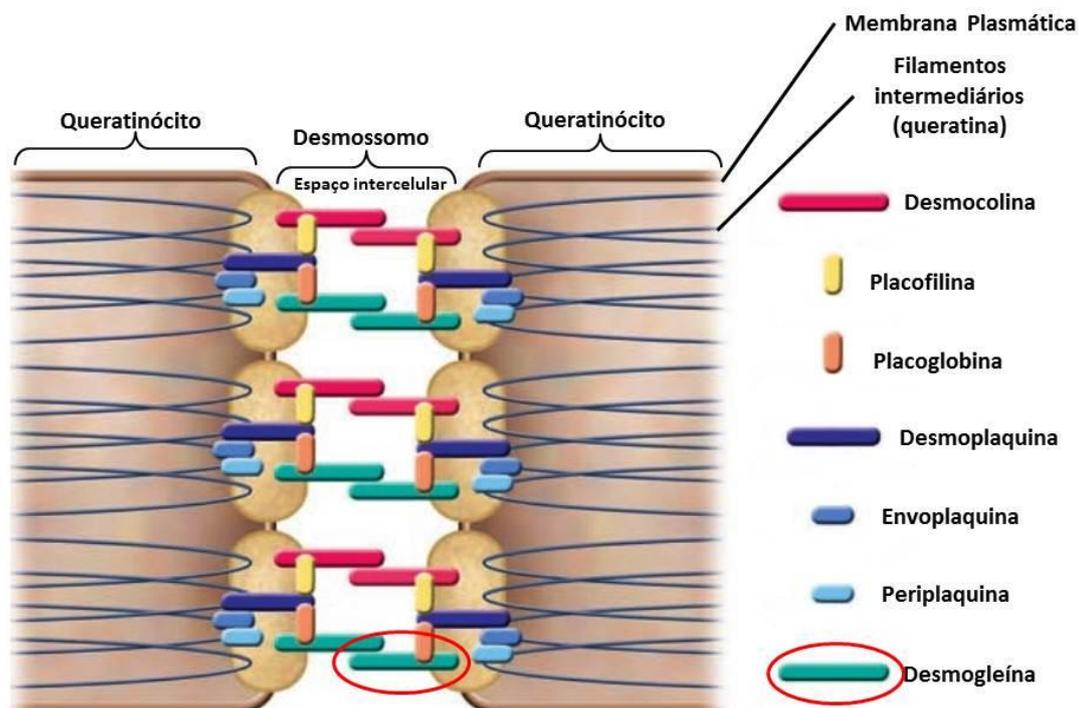


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESMOSSOMO. A coesão e integridade da epiderme dependem do desmossomo, uma estrutura de adesão celular ligada a membrana plasmática e formada por várias proteínas que conectam células adjacentes. Em destaque (círculo vermelho) a desmogleína, autoantígeno do pênfigo
 FONTE: HERTL et al., 2006. Modificado pelo autor.

Diferentes linhas de evidência confirmam a patogenicidade dos anticorpos anti-desmogleína 1 presentes no soro dos pacientes. Uma primeira constatação é a de que os níveis circulantes de autoanticorpos estão diretamente correlacionados com a atividade da doença (SAMS e JORDON, 1971; ISHII et al., 1997; SANTOS et al., 2001). Também foi demonstrado experimentalmente que a fração de IgG purificada a partir do soro de pacientes de pênfigo era capaz de induzir o desprendimento de células de cultura de tecido de pele, deixando o tecido com o mesmo aspecto histológico observado em biópsias de lesões de indivíduos doentes (SCHLITZ e MICHEAL, 1976; HASHIMOTO et al., 1983). Outra observação é a de que a transferência passiva de IgG purificada a partir do soro de pacientes para camundongos neonatos é capaz de provocar bolhas análogas às observadas em indivíduos com pênfigo (ANHALT et al, 1982; ROSCOE et al., 1985). A patogenicidade

desses anticorpos fica ainda mais evidente com um experimento envolvendo uma proteína quimérica contendo o domínio extracelular inteiro da desmogleína 1 e a região constante da IgG1. Essa proteína foi incubada com o soro de pacientes de pênfigo foliáceo e, como resultado, a imunorreatividade do soro foi completamente abolida, fazendo com que esse perdesse a capacidade, antes observada, de provocar lesões em camundongos neonatos (AMAGAI et al., 1995).

Apesar da patogenicidade dos autoanticorpos presente em pacientes de pênfigo já estar bem caracterizada, o mecanismo exato pelo qual esses anticorpos ocasionam as lesões ainda não é totalmente claro. Já foi proposto que perda de adesão e o desprendimento dos queratinócitos (fenômeno também conhecido como acantólise) estão relacionados com o sistema complemento, uma vez que certos componentes desse sistema estão presentes nas lesões (JORDON, 1980). Entretanto essa participação não foi corroborada por estudos mais recentes. A transferência passiva dos fragmentos proteolíticos Fab e F(ab')₂, da IgG de pacientes em camundongos neonatos é capaz de induzir a formação de bolhas epidérmicas, tanto em camundongos normais como em camundongos com deficiência de complemento (ESPANA et al., 1997). Isso está de acordo com o fato de que IgG4, o principal anticorpo envolvido com o pênfigo, não é capaz de fixar complemento. Porém, como IgG1 está frequentemente associada com a doença, uma ativação local do complemento pela via clássica é possível. Desse modo supõe-se que o complemento não tenha um papel central na formação das lesões, embora possa intensificá-las (DE MESSIAS et al., 1989).

A participação de proteases não específicas no processo de acantólise, particularmente do sistema plasminogênio-plasmina, também já foi evidenciada. Demonstrou-se que a ligação de autoanticorpos de pênfigo a células de epiderme humana em cultura induzem a síntese e secreção do ativador de plasminogênio (HASHIMOTO et al., 1983). Essa proteína ativa o plasminogênio induzindo a produção de plasmina que, teoricamente, lisaria as desmogleínas. Essa hipótese é reforçada com a observação de que o bloqueio do ativador de plasminogênio através do uso de anticorpos monoclonais, inibe de maneira significativa a acantólise observada em culturas de células de epiderme incubadas com IgG de pacientes de pênfigo (XUE et al., 1998).

Entretanto, há controvérsias quanto à participação do sistema plasminogênio-plasmina no processo de acantólise. O principal argumento é o de que a transferência passiva de IgG de pacientes para camundongos neonatos deficientes para o ativador de plasminogênio induz acantólise em níveis semelhantes ao observado em camundongos controles (MAHONEY et al., 1999). Além disso, a elevação desse ativador foi registrada na epiderme de indivíduos com psoríase, uma doença autoimune que também afeta a pele, mas sem acantólise. (SIPIERS et al., 1994). Assim como o sistema complemento, a participação plasminogênio/plasmina parece não ter um papel central na acantólise, podendo atuar secundariamente na intensificação das lesões.

Uma das primeiras (e principais) propostas sobre o mecanismo molecular da acantólise aponta para a interação direta entre autoanticorpo e desmogleína como responsável pelo desprendimento dos queratinócitos. Acredita-se que, por impedimento estérico, os autoanticorpos patogênicos sejam capazes de desestabilizar a ligação desmogleína-desmogleína, levando a acantólise (DIAZ e MARCELO, 1978). Essa hipótese é reforçada pela constatação de que indivíduos com síndrome da pele escaldada estafilocócica, condição em que toxinas bacterianas clivam a desmogleína 1, apresentam lesões com fenótipo histológico muito semelhante ao de pacientes de pênfigo foliáceo (AMAGAI, 2009). Contudo, recentemente foi proposto que a ligação de autoanticorpos com a desmogleína desencadeia cascatas de sinalização intracelular importantes na patogênese do pênfigo (BERKOWITZ et al., 2008). Diferentes estudos apontam para vias implicadas com a apoptose, indicando que esse processo pode estar entre as causas da acantólise, precedendo o desprendimento dos queratinócitos (PUVIANI et al., 2003; BARONI et al., 2004; ARREDONDO et al., 2005). Entretanto, a desestabilização por impedimento estérico e a apoptose não são ideias necessariamente excludentes, sendo que os dois fenômenos podem estar atuando em conjunto na acantólise. Entretanto, mesmo com avanço nessa área, o esclarecimento completo do mecanismo molecular que origina as lesões em pacientes de pênfigo ainda não foi possível e mais estudos são necessários.

Apesar de todos os estudos já realizados não explicarem completamente a acantólise, esse corpo de conhecimento acumulado possibilitou a elaboração

de uma hipótese que veio a ser conhecida como hipótese da compensação. Os desmossomos são estruturas de adesão celular que não são restritas aos queratinócitos ou a pele, estando presentes em cardiomiócitos, por exemplo. Eles são formados por várias proteínas, dentre elas as desmogleínas (Figura 3). A desmogleína 2 é expressa em todos os tecidos que apresentam desmossomos, já as desmogleínas 1 e 3 são restritas aos epitélios escamosos estratificados. Apesar de ambas serem expressas em tecido epitelial, as desmogleínas 1 e 3 diferem quanto a sua distribuição dentro do tecido. Na pele, a desmogleína 1 está presente nas camadas mais superficiais (subcórnea) do epitélio, enquanto a desmogleína 3 é restrita a camada inferior (suprabasal). Já nas membranas mucosas a expressão de desmogleína 1 é mais limitada, com a desmogleína 3 estando distribuída por todo epitélio. Essa distribuição explica as diferenças entre as lesões observadas em pacientes de pênfigo vulgar (cujo antígeno principal é a desmogleína 3) e pênfigo foliáceo (cujo antígeno é a desmogleína 1). Como na camada subcórnea da pele apenas a desmogleína 1 está presente, pacientes de pênfigo foliáceo apresentam bolhas superficiais, com a desmogleína 3 mantendo as camadas mais basais integras. Nesses indivíduos a mucosa não é afetada, pois a presença da desmogleína 3 compensa a perda de função da a desmogleína 1 (Figura 4). Já pacientes de pênfigo vulgar, apresentam lesões inicialmente restritas as mucosas (onde a desmogleína 1 é mais escassa) sem o envolvimento da pele, onde a perda de função da desmogleína 3 é compensada pela presença da desmogleína 1, que mantém o tecido. Entretanto, com o passar do tempo, alguns pacientes de pênfigo vulgar podem evoluir para uma forma mucocutânea da doença, na qual também estão presentes anticorpos contra desmogleína 1, levando a formação de lesões graves também na pele. A hipótese da compensação também explica o porquê da observação de que recém-nascidos de mães com pênfigo vulgar apresentam acantólise enquanto os de mães com pênfigo foliáceo não. Durante a gravidez os autoanticorpos da mãe conseguem ultrapassar a barreira placentária e se ligam à epiderme do feto. Porém, diferentemente do adulto, a distribuição da desmogleína 3 nos recém-nascidos se dá em toda a pele, se assemelhando a das membranas mucosas, prevenindo o aparecimento de lesões em filhos de mães com pênfigo foliáceo (WU et al.,

2000). A teoria da compensação não sustenta a hipótese de participação de mecanismos não específicos no processo de acantólise, como a degradação das desmogleínas por proteases, por exemplo. Processos não específicos que levassem a perda de função de uma das desmogleínas provavelmente também afetariam as demais, não acarretando o fenômeno da compensação.

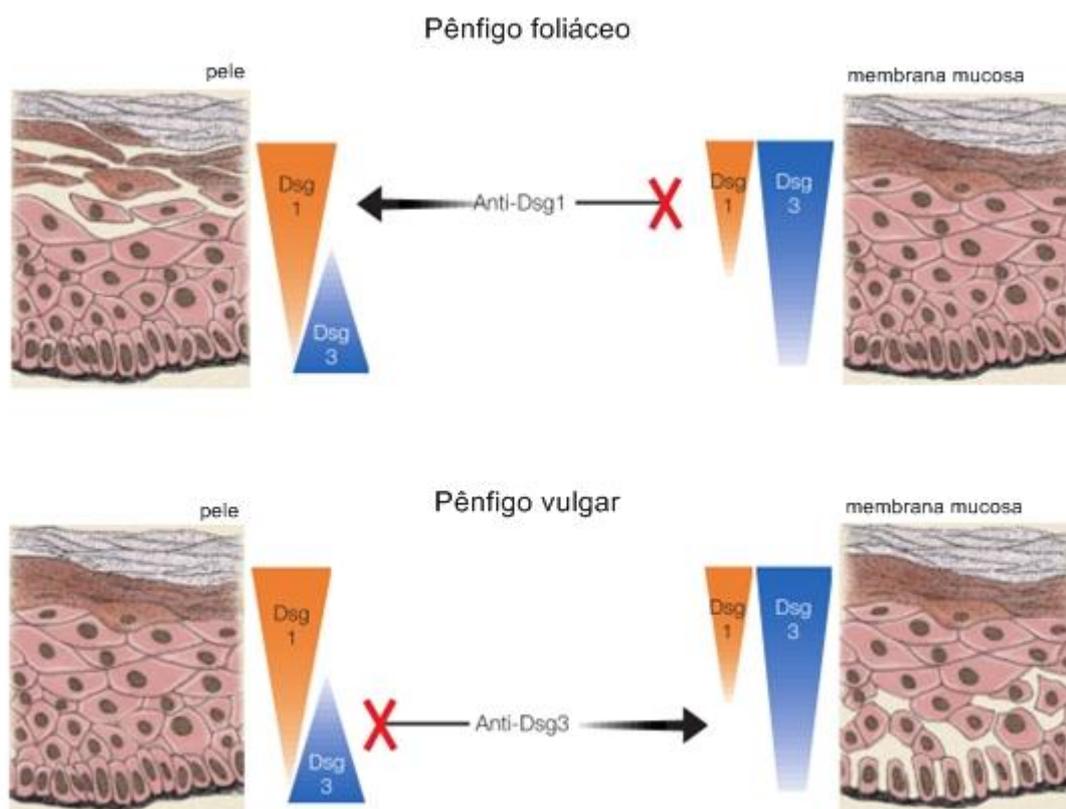


FIGURA 4 – HIPÓTESE DA COMPENSAÇÃO. O que se observa é que na presença de anticorpos anti-desmogleína (Dsg), a lesão só é formada caso essa seja a molécula predominante no tecido. Anticorpos anti-Dsg1 provocam lesões na pele, onde Dsg3 é restrita, mas não na mucosa, onde Dsg3 compensa a perda de função de Dsg1 (parte superior da figura). Analogamente, anticorpos anti-Dsg3 provocam lesões nas membranas mucosas, onde Dsg1 é restrita. Na pele, a perda de função da Dsg3 é compensada pela Dsg1 (parte inferior da figura)

FONTE: UDEY et al., 1999. Modificado pelo autor.

A resposta imunológica humoral a antígenos proteicos depende da ativação de linfócitos B e da geração de células produtoras de anticorpos. Esse processo requer a participação de linfócitos T auxiliares, que devem ser capazes de reconhecer o antígeno e estimular os linfócitos B. Esse reconhecimento se dá através da interação entre moléculas MHC (também chamadas de HLA, em humanos) ligadas ao peptídeo antigênico (presentes na

superfície das células B) e os receptores das células T, que então ativam as células B com a ajuda de uma série de moléculas coestimuladoras. O pênfigo é uma doença autoimune mediada por autoanticorpos e, como tal, sua manifestação também depende da interação entre linfócitos T e B. Entretanto, em condições normais, a manutenção e atividade de linfócitos que respondem a antígenos próprios são impedidas através de uma série de mecanismos de tolerância. Esses mecanismos normalmente estão atrelados à ontogenia dessas células, sendo elas checadas em diferentes estágios do desenvolvimento nos quais podem ser induzidas para um estado anérgico, ou ocorrer deleção clonal, por exemplo. Apesar disso, a eliminação dos linfócitos autorreativos não é completa e algumas dessas células chegam a se desenvolver. Em geral linfócitos autorreativos são mantidos sobre supressão ativa, tendo sua atividade modulada por células T reguladoras. Mesmo assim esses mecanismos de tolerância ao próprio são, eventualmente, quebrados e levam a autoimunidade.

Já foi demonstrado que a interação entre os receptores das células T e moléculas MHC de classe II é essencial para a ativação das células B desmogleína-específicas e secreção dos autoanticorpos em pacientes de pênfigo (NISHIFUJI et al., 2000). Demonstrou-se também (com a ajuda de um elegante modelo experimental sumarizado na Figura 5) que a produção de anticorpos contra a desmogleína depende da perda de tolerância tanto de linfócitos T como de linfócitos B (TSUNODA et al., 2002). A participação de células T reguladoras na patogênese do pênfigo também já foi explorada, e aparentemente a manutenção da tolerância depende do funcionamento normal dessas células (VELDMAN et al., 2006; SUGIYAMA et al., 2007), contudo a compreensão de seu papel na doença ainda é inicial.

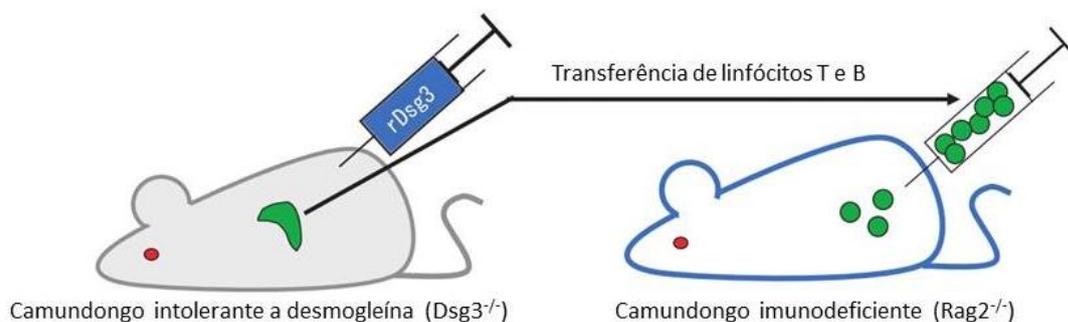


FIGURA 5 – MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOIMUNIDADE NO PÊNFIGO. Nesse modelo, um camundongo *knock out* para desmogleína 3 é imunizado com desmogleína 3 recombinante. Os linfócitos desse animal são transferidos para um segundo camundongo, incapaz de produzir linfócitos maduros. Como esse outro camundongo expressa desmogleína 3 normalmente, os linfócitos reativos transferidos desencadeiam a produção de anticorpos anti-Dsg3, simulando a autoimunidade. Transferindo-se linfócitos T do camundongo $Dsg3^{-/-}$ em conjunto com linfócitos B de um camundongo selvagem, e vice e versa, não são observados anticorpos contra a desmogleína, indicando que a autoimunidade depende da quebra de tolerância tanto de células B como de células T

FONTE: Amagai, 2010. Modificado pelo autor.

2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico de pênfigo foliáceo é realizado baseando-se em critérios clínicos (sendo o sinal de Nikolsky uma das principais manifestações clínicas), na histopatologia e em imunofluorescência direta e indireta.

Atualmente o tratamento consiste em imunossupressão, com a utilização principalmente de corticóides sistêmicos administrados por via oral. Em geral o tratamento é prolongado, com elevada probabilidade de efeitos colaterais, tais como o desenvolvimento de infestações intestinais e infecções bacterianas extracutâneas (pneumonias, infecções urinárias, tuberculose, septicemias, entre outras). Também pode ocorrer hipertensão, hiperglicemia, aumento de peso, osteoporose, gastrite e úlcera gastrintestinal e surtos psicóticos. Recomenda-se também que os pacientes protejam-se da luz solar, já que a radiação ultravioleta pode induzir ou agravar a formação de bolhas.

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Uma das características marcantes do pênfigo foliáceo é a sua epidemiologia. Ele pode ser classificado em duas formas: a endêmica e a não endêmica. A forma não endêmica ocorre esporadicamente em todo o mundo, tendo sido descrita pela primeira vez por Pierre Louis Alphee Cazenave, no ano de 1844 em Paris. Já a forma endêmica, conhecida como fogo selvagem (no passado designada pênfigo brasileiro ou pênfigo sul americano), foi registrada pela primeira vez no Brasil em 1903. Essas duas formas apresentam as mesmas manifestações clínicas e histopatológicas, diferenciando-se apenas quanto à epidemiologia. A existência de uma forma endêmica de uma doença autoimune é incomum e é uma das características marcantes do pênfigo foliáceo.

A forma esporádica do pênfigo tem baixa incidência e prevalência, afetando principalmente indivíduos acima de 40 anos de idade. Sua incidência pode variar entre regiões e grupos étnicos, mas em geral não supera 3 casos por milhão de habitantes por ano. Em conjunto, a análise dos diversos estudos epidemiológicos já realizados sugere que a incidência da doença é maior em latitudes menores (MEYER e MISERY, 2009). Essa constatação pode ser exemplificada comparando-se os números da Finlândia (64°0'0" norte) com 0,076 casos por milhão de habitantes por ano (HIETANEN e SALO, 1982) e da França (43°36'19" norte) com 1,55 casos por milhão de habitantes por ano (THOMAS et al., 2010).

O pênfigo foliáceo endêmico ocorre no Brasil nas regiões localizadas entre as longitudes 45° e 60° oeste e latitudes 5° e 25° sul (Figura 6) em altitudes que variam entre 500 e 800 metros. Tipicamente a doença se manifesta em crianças e jovens; com o pico de incidência entre a segunda e terceira décadas de vida, acometendo principalmente pessoas que residem (ou que ao menos residiram) em áreas rurais e nas proximidades de rios e córregos (CULTON et al., 2008), apresentando uma razão de homens e mulheres afetados de aproximadamente 1:1 (DIAZ et al., 1989). Na área endêmica sua incidência é bastante elevada, com cerca de 25 casos por milhão de habitantes por ano. Além disso, a doença apresenta alta prevalência

em certas comunidades indígenas, como os Xavantes, do estado do Mato Grosso, e Terena, do Mato Grosso do Sul (Figura 6), atingindo 1.4% e 3.4%, respectivamente (FRIEDMAN et al., 1995; WARREN et al., 2000)



FIGURA 6 – ÁREA ENDÊMICA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO. A área delimitada em vermelho representa de maneira aproximada a zona endêmica de ocorrência do pênfigo foliáceo, com incidência superior a da forma esporádica observada no resto do globo. Mesmo dentro dessa região existem locais de maior ou menor incidência, sendo observada uma diminuição bastante acentuada no número de casos em locais densamente urbanizados. Os pontos em vermelho marcam as comunidades indígenas Terena (mais ao sul) e Xavante (mais ao norte) onde uma prevalência excepcionalmente alta da doença é observada. Além do Brasil, países limítrofes, como Paraguai, Bolívia, Peru e Colômbia, também têm incidência mais elevada do que a de outras regiões do mundo.

FONTE: Google Maps. Modificado pelo autor.

O primeiro caso de pênfigo foliáceo registrado no Brasil data de 1903, embora já existissem relatos de supostos pacientes que datam da primeira metade do século XVIII. Historicamente, o que se observa no início do século XX é o aparecimento de um foco endêmico no estado do Mato Grosso, seguido por um aumento no número de casos no estado de Minas Gerais e na região nordeste do estado de São Paulo. O número de casos continuou a subir em

São Paulo durante toda a década de 30. Esse panorama se mantém durante a década de 40, quando um aumento significativo no número de casos é observado em Goiás, que nos anos 50 passa a ser o estado com o maior número de doentes. Nesse mesmo período os casos observados no norte do Paraná também aumentam dramaticamente, assim como na região que hoje corresponde ao Mato Grosso do Sul. A partir da segunda metade da década de 70 já se nota uma grande diminuição no número de doentes em focos importantes como Paraná e São Paulo, com a doença praticamente desaparecendo dessas regiões. Na sequência a área endêmica se estabiliza na região Centro-Oeste, foco que permanece ativo até há pelo menos uma década. (CAMPBELL et al., 2001). Resumidamente, o que se observa é a expansão da endemicidade, coincidindo com o desbravamento e ocupação de certas regiões do Brasil, seguida por uma queda drástica no número de casos à medida que essas regiões se urbanizam. Apesar dessa redução na incidência, ainda se observa uma área endêmica importante que se mantém estável.

Além do Brasil, outros focos endêmicos também são observados. Na Tunísia a incidência de pênfigo é de 6,7 casos por de habitantes milhão por ano, com uma proporção de mulheres para homens afetados de 4:1 com maior incidência entre mulheres jovens (MORINI et al., 1993; BASTUJI-GARIN et al., 1995). Já na Colômbia, outra área endêmica, os principais afetados são homens por volta dos 40 anos envolvidos com a atividade mineradora (ROLBEDO et al., 1988).

2.6 ETIOLOGIA DO PÊNFIGO FOLIÁCEO

O pênfigo foliáceo é uma doença complexa e multifatorial. Sua manifestação depende da interação entre fatores genéticos e ambientais, não podendo ser atribuída a um fator isolado. Um número apreciável de genes envolvidos com o pênfigo já foi identificado, mas a compreensão desses fatores ainda é incompleta, mesmo com os recentes avanços. Já no que diz respeito aos fatores ambientais, a situação é ainda menos esclarecida. Apesar de algumas hipóteses terem sido levantadas, não houve ainda demonstração

formal e conclusiva sobre quais seriam os fatores ambientais desencadeadores da doença.

Com base nos conhecimentos existentes até o momento, foi proposto um modelo em etapas. Inicialmente um indivíduo é exposto a um antígeno ambiental desencadeador. Acredita-se que esse antígeno seja estruturalmente semelhante à desmogleína 1, levando a formação de autoanticorpos não patogênicos contra o ectodomínio 5 (EC5) da molécula de desmogleína 1 (figura 7). De fato, um grande número de indivíduos normais que habitam áreas endêmicas apresentam anticorpos anti-EC5, sem manifestações da doença, caracterizando um estágio pré-clínico (WARREN et al., 2000). A transferência passiva de anticorpos anti-EC5 não é capaz de provocar lesões em camundongos neonatos (LI et al., 2003). Essa ausência de patogenicidade é atribuída à natureza críptica do EC5. Esse ectodomínio se encontra bastante próximo à membrana plasmática e supostamente não está exposto *in vivo*. Na sequência, indivíduos geneticamente susceptíveis passariam a desenvolver anticorpos contra os ectodomínios 1 e 2 (EC1 e EC2, respectivamente), esses sim patogênicos, levando a perda de tolerância e o aparecimento das lesões. Como não há grande homologia entre EC5 e EC1/EC2, a transição do estágio pré-clínico para o estágio clínico, não parece ocorrer pelo mecanismo de reação cruzada. Possivelmente o aparecimento desses novos anticorpos se dá pelo espalhamento de epítomos, fenômeno no qual células B e/ou células T passam a reconhecer novos epítomos que não apresentam reação cruzada com o epítomo original e que podem estar localizados na mesma molécula ou não.

Diversos fatores ambientais já foram propostos como importantes no desenvolvimento do pênfigo foliáceo. Supostamente, picadas de insetos hematófagos poderiam desencadear a autoimunidade, sendo que a molécula que reagiria de forma cruzada com a Dsg1 seria um antígeno salivar (AOKI et al., 2004). Também foi sugerido para forma endêmica de pênfigo que ocorre na Tunísia que a utilização de cosméticos tradicionais seria um fator de risco (BASTUJI-GARIN et al., 2002). Já para a forma endêmica da Colômbia suspeita-se do envolvimento do mercúrio e outros compostos ligados à mineração (ABRÈU-VELEZ et al., 2003). Entretanto, a compreensão desse

tema é limitada e a importância de outros fatores como dieta, estresse emocional, contato com alérgenos, etc., também foi proposta.

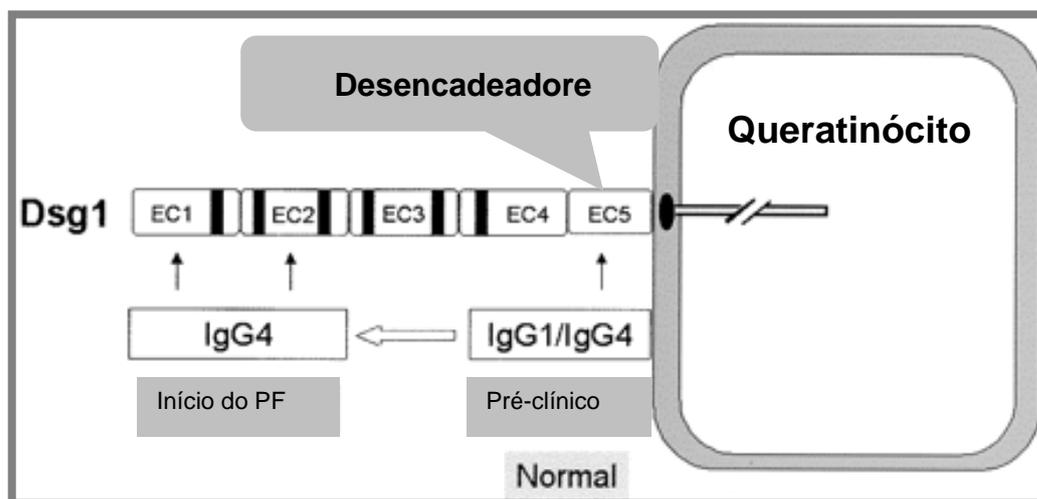


FIGURA 7 - DESMOGLEÍNA 1 E O DESENVOLVIMENTO DO PÊNFIGO FOLIÁCEO. Primeiramente fatores ambientais desencadeiam a produção de anticorpos IgG1 e IgG4 não-patogênicos contra o EC5. Então, indivíduos geneticamente predispostos passam pelo processo de espalhamento de epítopos, com a geração de anticorpos patogênicos IgG4 contra EC1 e EC2, desencadeando a doença
 FONTE: LI et al., 2003. Modificado pelo autor.

Entre as associações genéticas encontradas com o pênfigo, as mais fortes foram com alelos MHC de classe II. Diversos estudos de genética epidemiológica consistentemente apontam nessa direção, com associações importantes descritas com pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e até pênfigo paraneoplásico (TRON et al., 2005). Essas associações são atribuídas à função dessas moléculas na resposta imune. Aminoácidos polimórficos no sítio de ligação aos peptídeos de proteínas MHC de classe II definem sua afinidade na ligação de diferentes peptídeos que estão sendo apresentados, determinando a capacidade de um indivíduo montar uma resposta imune a certo antígeno, seja ele estranho ou próprio. Em pacientes de pênfigo foliáceo foram demonstradas inicialmente associações positivas com HLA DR1 e DR4, e associação negativa com DQ2 (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989). Estes resultados foram revisados e ampliados com o uso de técnicas moleculares, avaliando a alelos de HLA-DRB1, confirmando resultados anteriores e detalhando essa associação (PAVONI et al., 2003). Entre os alelos

positivamente associados estão DRB1*01:01, *01:02 (OR=10.36, $p=10^{-6}$), *01:03, *04:04 *04:06, *04:10, *14:06 e *16:01, e entre os negativamente associados DRB1*03:01, *07:01 (OR=0.09, $p=10^{-6}$), *08:01 *11:01 e *11:04. Os alelos de susceptibilidade aparentemente são semi-dominantes em relação aos alelos neutros. Já os alelos protetores seriam semi-dominantes em relação às variantes de susceptibilidade e dominantes em relação aos alelos neutros. Esses resultados ressaltam a importância dos genes MHC de classe II no estabelecimento do pênfigo foliáceo.

Além de genes *MHC de classe II*, também já foram observadas associações com *CD40L*, *CD40*, *BLYS*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *PDCD1*, *CTLA4* e *CD86*, (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009; PEREIRA et al., 2004; BRAUN-PRADO e PETZL-ERLER, 2007; DALLA-COSTA et al., 2010). Não foram observadas associações com polimorfismos dos genes *TNF*, *LTA*, *DSG1*, *BAX*, *TP53*, *CD28*, *CD80* e *CD19* (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009; ROXO et al., 2003; PETZL-ERLER e MALHEIROS, 2005; KÖHLER e PETZL-ERLER, 2006; DALLA-COSTA et al., 2010).

2.7 EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES DE PÊNFIGO FOLIÁCEO

Até recentemente, o estudo dos fatores genéticos envolvidos na susceptibilidade ao pênfigo foliáceo consistia somente em estudos populacionais do tipo caso controle, com análise de polimorfismos de poucos genes ou regiões do genoma. Essa abordagem provou ser muito útil, revelando associações importantes como, por exemplo, as descritas com MHC de classe II. Em geral, quando um estudo desse tipo é projetado, alguns genes são eleitos como “candidatos” a associação genética com a doença em questão. Diferentes critérios podem ser adotados para se definir um bom candidato e, normalmente, leva-se em conta o que já se conhece sobre a função do gene que se pretende estudar. Um problema decorrente dessa escolha é limitada pelo conhecimento prévio, sendo que genes cuja função é parcialmente compreendida ou desconhecida dificilmente serão considerados candidatos. Desse modo podem ser excluídos da análise genes de grande relevância para a doença.

Nesse contexto, Malheiros e colaboradores conduziram um estudo em 2009 comparando a expressão genica global entre diferentes subgrupos de pacientes de pênfigo e indivíduos livres da doença. Utilizando a tecnologia de microarranjos de oligonucleotídeos o perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ foi analisado. Diversas comparações foram realizadas entre pacientes de pênfigo foliáceo com a forma generalizada ou localizada da doença, sob ou sem tratamento imunossupressor, pacientes de pênfigo vulgar e indivíduos controle. Muitas diferenças foram observadas, com 135 genes diferencialmente expressos ao se comparar pacientes com a forma generalizada da doença e sem tratamento imunossupressor com indivíduos controles, dos quais 122 estavam induzidos e 13 reprimidos nos pacientes. Esses resultados, levando em conta o caráter global do estudo, não dependiam de nenhum critério estabelecido previamente pelos autores. Os genes identificados como diferencialmente expressos estavam relacionados com diferentes processos, tais como adesão e migração de linfócitos, apoptose, proliferação celular e apresentação de antígenos e alguns dessas dificilmente seriam considerados como candidatos para estudos de genética epidemiológica. Outra constatação foi a de que a região cromossômica 19q13 continha o maior número de genes diferencialmente expressos sendo considerada uma região que possivelmente abriga vários genes de susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. Dentre eles se encontra *NLRP12*, gene que pertencente à família gênica NLR e está envolvido na modulação da resposta imune, mas ainda pouco explorado no contexto da autoimunidade.

2.8 A FAMÍLIA GÊNICA NLR

A família gênica NLR (*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing*) foi descrita no início dos anos 2000 por diferentes grupos de pesquisa. Seus genes codificam as proteínas NLR, moléculas intracelulares solúveis caracterizadas pela presença de um domínio de ligação a nucleotídeos (NBD, *nucleotide-binding domain*) e um domínio rico em repetições de leucina (LRR, *leucine-rich repeats*).

Essas proteínas apresentam uma relação tanto estrutural como funcional com um subgrupo de moléculas de resistência a doenças encontrados em plantas (proteínas R). As plantas, ao contrário dos mamíferos, não apresentam células de defesa com capacidade de locomoção ou um sistema imune adaptativo. Para a sua defesa elas dependem da capacidade individual de cada célula e com sinais sistêmicos emitidos a partir dos locais de infecção (DANGL e JONES, 2001). Seu sistema imune pode ser dividido basicamente em dois ramos. Um deles consiste em receptores de membrana que reconhecem padrões moleculares conservados associados a patógenos (tais como flagelina). O outro ramo é caracterizado por proteínas polimórficas que, assim como as proteínas NLR humanas, agem principalmente intracelularmente e apresentam uma estrutura básica NBD-LRR. Essas proteínas NBD-LRR são capazes de reconhecer moléculas efetoras produzidas por diferentes microrganismos tanto de maneira direta como indireta, monitorando a integridade dos alvos desses efetores patogênicos (JONES e DANGL, 2006).

A homologia entre as proteínas R e a família NLR já foi demonstrada através de análises filogenéticas (TING e DAVIS, 2005). Entretanto, as proteínas envolvidas na regulação dessas moléculas, assim como as cascatas de sinalização observadas não são conservadas e indicam um caso de evolução convergente (AUSUBEL, 2005). A origem das proteínas NLR parece ser bastante antiga e remonta ao início da evolução dos metazoários (LANGE et al., 2010).

Em humanos a família gênica NLR é formada por 22 genes distribuídos nos cromossomos 1, 2, 5, 7, 11, 16, 17 e, em especial, no braço longo do cromossomo 19 (Figura 8).

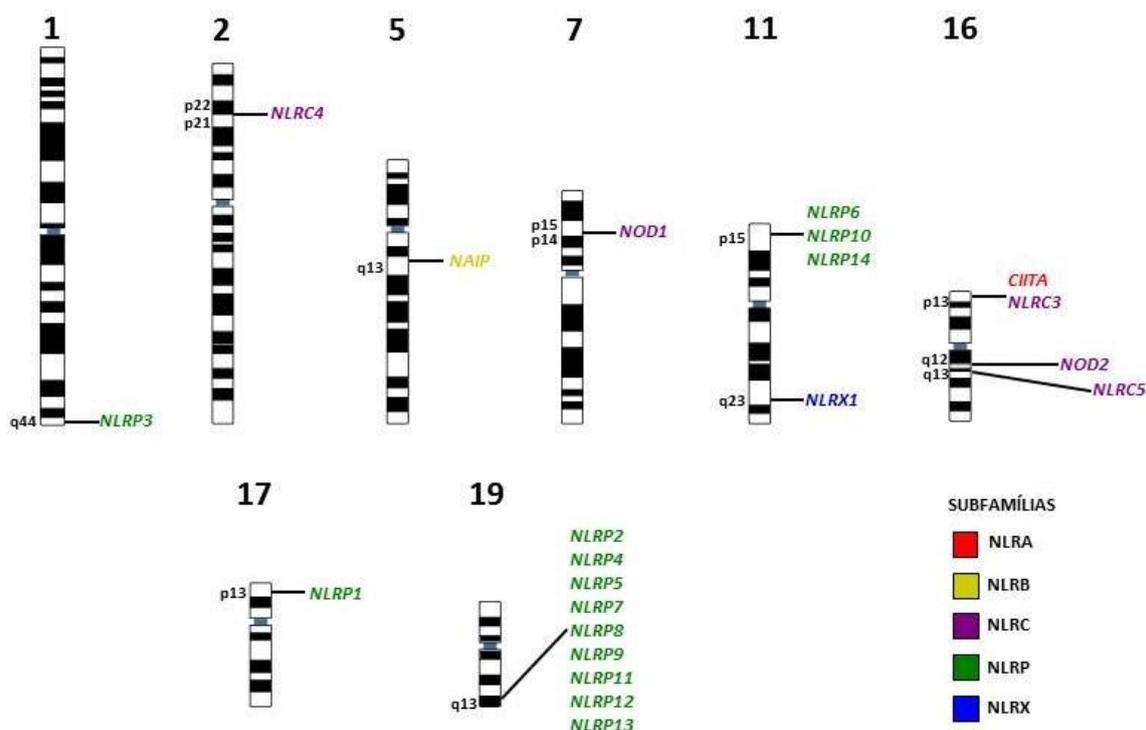


FIGURA 8 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DA FAMÍLIA NLR. Representação cromossômica apontando a posição dos genes da família NLR. Estão indicados os genes (a direita) e regiões cromossômicas e bandas (a esquerda). Ficam evidenciados dois agrupamentos gênicos, sendo um no cromossomo 11 e outro no cromossomo 19.

FONTE: O autor.

Sua estrutura geral é formada por três domínios distintos. O domínio carboxi-terminal de reconhecimento de ligante (LRD, *ligand-recognition domain*) é constituído por repetições ricas em leucina (LRR). Juntamente com o domínio central de ligação a nucleotídeos (NBD, *nucleotide-binding domain*) eles caracterizam a família NLR. Já o domínio amino-terminal efetor (EBD, *effector-binding domain*) é variável. Desse modo essas moléculas podem ser classificadas em cinco subfamílias que se diferenciam quanto ao EBD presente. A subfamília NLRA tem como EBD um domínio ácido transativador (*acidic transactivation domain*, AD); a subfamília NLRB, domínio de repetição inibidora baculoviral (*baculoviral inhibitory repeat*, BIR); a subfamília NLRC um domínio recrutador de caspase (*caspase recruitment domain*, CARD); a subfamília NLRP um domínio pirina (*pyrin domain*, PYD); e a subfamília NLRX

que apresenta um domínio semelhante à CARD, mas ainda não totalmente caracterizado (Figura 9).

Apesar dessa variação estrutural exibida pelas proteínas NLR, elas aparentemente atuam de maneira semelhante no organismo, reconhecendo moléculas específicas e modulando o sistema imune. Essas proteínas pertencem a um conjunto de receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de patógenos (*pathogen-recognition receptors*, PRR) que são capazes de reconhecer estruturas moleculares derivadas de microrganismos, também chamadas de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) como, por exemplo, lipopolissacarídeos ou peptidoglicanas (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002).

As proteínas NLR, assim como os receptores semelhantes a Toll (*Toll-like receptors*, TLR) reconhecem esses PAMPs e outras moléculas que indicam perigo ao organismo. Quando ativados são capazes de induzir uma série de moléculas coestimuladoras e outras respostas fisiológicas (MARTINON e TSCHOPP, 2005). Mas, diferentemente dos TLR, os NLR atuam de maneira intracelular, reconhecendo moléculas presentes no citoplasma da célula.

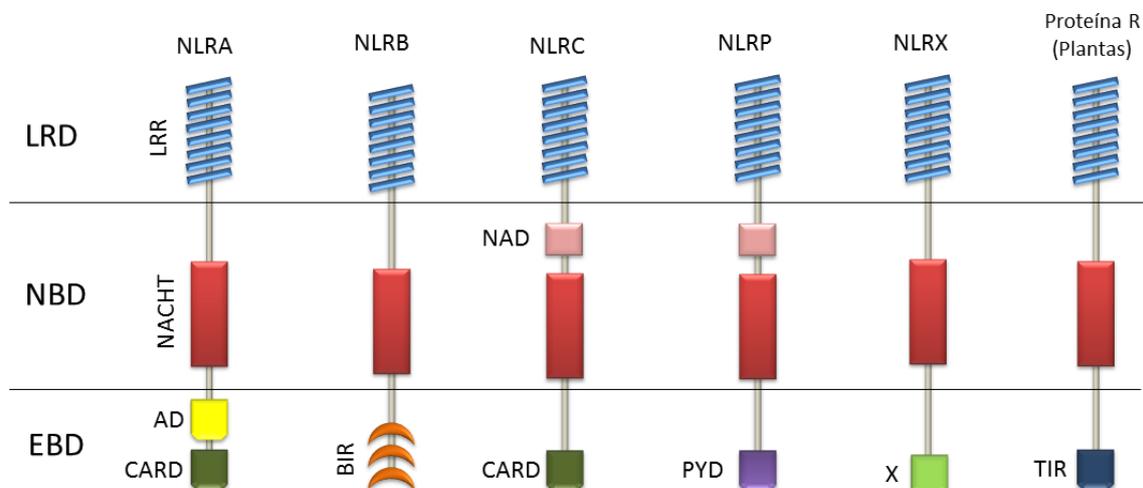


FIGURA 9 – ESTRUTURA GERAL DAS PROTEÍNAS NLR. Embora alguns dos membros dessa família apresentem particularidades e a estrutura de algumas dessas proteínas ainda seja debatida, a figura representa esquematicamente os padrões gerais dessas moléculas. LRD, *ligand-recognition domain*; NDB *nucleotide-binding domain*; EBD, *effector-binding domain*; LRR, *leucine-rich repeats*; AD, *acidic transactivation domain*; BIR, *baculoviral inhibitory repeat*; CARD, *caspase recruitment domain*; PYD, *pyrin domain*; X, domínio não determinado; TIR, *TLR-IL1/18 receptor*; NAD, *NACHT associated domain*; NACHT, sigla derivada de quatro proteínas nas quais esse domínio foi inicialmente caracterizado: *neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)*, *MHC class II transcription activator (CIITA)*, *incompatibility locus protein from *Podospora anserina* (HET-E)*, e *telomerase-associated protein (TP1)*.

FONTE: O autor.

2.9 NOMENCLATURA DOS GENES NLR

A partir do ano 2000, os genes NLR passaram a receber grande atenção por parte da comunidade científica. Isso acarretou a descoberta de vários genes pertencentes a essa família. Entretanto, os grupos de pesquisa envolvidos atribuíram a estes genes diferentes nomes: CATERPILLER (HARTON et al., 2002; TING e DAVIS, 2005), NODS (INOHARA et al. 2002), NOD-LRR (INOHARA e NUÑEZ, 2003; INOHARA et al., 2005), NACHT-LRR

(MARTINON e TSCHOPP, 2005) e NOD-like receptor (FRITZ et al., 2006; MEYLAN et al., 2006). Tal fato gerou grande confusão na literatura. Apenas em 2008, após uma ampla consulta envolvendo mais de 100 pesquisadores e os comitês de nomenclatura gênica humana e de camundongos, uma nomenclatura oficial foi aprovada (TING et al., 2008) (Tabela 1).

TABELA 1 – NOMENCLATURA DA FAMÍLIA GÊNICA *NLR*. Nomenclatura oficial da família *NLR* aprovada em 2008 pela *Human Genome Organization*

Família NLR	Símbolo	Nome	Localização	Sinônimos
NLRA				
	CIITA	class II, major histocompatibility complex, transactivator	16p13	NLRA; MHC2TA; C2TA
NLRB				
	NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	5q13.1	NLRB1; BIRC1; CLR5.1
NLRC				
	NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	7p15-p14	NLRC1; CARD4; CLR7.1
	NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2	16q21	NLRC2; CARD15; CD; BLAU; IBD1; PSORAS1; CLR16.3
	NLRC3	NLR family, CARD domain containing 3	16p13.3	NOD3; CLR16.2
	NLRC4	NLR family, CARD domain containing 4	2p22-p21	CARD12; CLAN; CLR2.1; IPAF
	NLRC5	NLR family, CARD domain containing 5	16q13	NOD27; CLR16.1
NLRP				
	NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1	17p13.2	NALP1; DEFCAP; NAC; CARD7; CLR17.1
	NLRP2	NLR family, pyrin domain containing 2	19q13.42	NALP2; PYPAF2; NBS1; PAN1; CLR19.9
	NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3	1q44	CIAS1; PYPAF1; Cryopyrin; CLR1.1; NALP3
	NLRP4	NLR family, pyrin domain containing 4	19q13.42	NALP4; PYPAF4; PAN2; RNH2; CLR19.5
	NLRP5	NLR family, pyrin domain containing 5	19q13.42	NALP5; PYPAF8; MATER; PAN11; CLR19.8
	NLRP6	NLR family, pyrin domain containing 6	11p15	NALP6; PYPAF5; PAN3; CLR11.4
	NLRP7	NLR family, pyrin domain containing 7	19q13.42	NALP7; PYPAF3; NOD12; PAN7; CLR19.4
	NLRP8	NLR family, pyrin domain containing 8	19q13.42	NALP8; PAN4; NOD16; CLR19.2
	NLRP9	NLR family, pyrin domain containing 9	19q13.42	NALP9; NOD6; PAN12; CLR19.1
	NLRP10	NLR family, pyrin domain containing 10	11p15.4	NALP10; PAN5; NOD8; PYNOD; CLR11.1
	NLRP11	NLR family, pyrin domain containing 11	19q13.42	NALP11; PYPAF6; NOD17; PAN10; CLR19.6
	NLRP12	NLR family, pyrin domain containing 12	19q13.42	NALP12; PYPAF7; Monarch1; RNO2; Monarch1; RNO2;
	NLRP13	NLR family, pyrin domain containing 13	19q13.42	NALP13; NOD14; PAN13; CLR19.7
	NLRP14	NLR family, pyrin domain containing 14	11p15.4	NALP14; NOD5; PAN8; CLR11.2
NLRX				
	NLRX1	NLR family member X1	11q23.3	NOD9; CLR11.3

FONTE: TING et al., 2008. Modificado pelo autor.

2.10 FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS NLR

As proteínas NLR são proteínas reguladoras do sistema imune. Sua função mais proeminente é a ativação da imunidade inata mediante infecções microbianas. Nos últimos anos muito se descobriu sobre a função e os mecanismos de ação dessas proteínas. Elas podem ser agrupadas, de maneira geral, em três grupos funcionais: fatores de transcrição; ativadoras formadoras de inflamassomo e ativadoras não formadoras de inflamassomo (MAGALHAES et al., 2010).

A maior parte das proteínas NLR corresponde a proteínas ativadoras formadoras de inflamassomo. Os inflamassomos são complexos proteicos de alto peso molecular formados por proteínas que se auto-oligomerizam formando um esqueleto capaz de recrutar outras moléculas, tais como caspases, e promover a maturação de mediadores inflamatórios (MARTINON et al., 2002). As principais proteínas implicadas nos inflamassomos são justamente as proteínas NLRP. Porém, apesar da participação de várias delas na formação dos inflamassomos ter sido demonstrada *in vitro*, apenas algumas tiveram sua função fisiológica esclarecida *in vivo* (SCHRODER e TSCHOPP, 2010). Os detalhes envolvendo a formação e a ação desses complexos serão discutidos mais adiante.

Entretanto, estudos revelam uma participação importante de algumas proteínas NLR na ativação da imunidade inata mesmo sem a formação de inflamassomos. NOD1 e NOD2, por exemplo, são capazes de detectar a presença citosólica de peptidoglicanos bacterianos específicos (GIRARDIN et al., 2003; CHAMAILLARD et al., 2003). Esses peptidoglicanos podem ser resultado tanto da divisão celular de bactérias encontradas no citoplasma de uma célula infectada como podem escapar de lisossomos nos quais uma bactéria fagocitada tenha sido degradada. Após o reconhecimento dessas moléculas NOD1 e NOD2 são ativados e recrutam quinases que em última análise levam a ativação de NF- κ B (SHAW et al., 2010).

A proteína NRLX1 também não está envolvida com os inflamassomos, sendo a única proteína da família NLR com uma localização mitocondrial. Trata-se de uma proteína bastante conservada entre espécies e que se

expressa em uma ampla gama de células do sistema imune e em outros tipos celulares. O direcionamento para mitocôndria acontece através de uma sequência sinal encontrada na porção amino-terminal da proteína, mas sua sub-localização na organela ainda não é clara (ARNOULT et al., 2009). A compreensão da função de NLRX ainda é incipiente e já foram apontados papéis na resposta antiviral (MOORE et al., 2008); na produção de espécies reativas de oxigênio, amplificando as cascatas de sinalização das vias inflamatórias (TATTOLI et al., 2008); e na resposta a infecções bacterianas (ABDUL-SATER et al., 2010).

Outra função importante é a de fator de transcrição. A proteína transativadora de MHC de classe II, CIITA, é o principal fator de transcrição das moléculas MHC de classe II. Ela foi a primeira proteína NLR descrita em humanos e pode ser considerada como a “fundadora” dessa família (TING e TROWSDALE, 2002), sendo que sua descrição antecedeu em quase uma década a caracterização dessas proteínas como família (STEIMLE et al., 1993).

Mais recentemente foi sugerido que NLRC5, a proteína filogeneticamente mais próxima de CIITA, também atue como um fator de transcrição. Ao invés de modular a expressão das moléculas MHC de classe II, NLRC5 atuaria como um fator chave na expressão de MHC de classe I (MEISSNER et al., 2010).

NLRP12 também apresenta uma função diferenciada. Ao contrário da maioria das proteínas NLR que apresentam funções ativadoras pró-inflamatórias, NLRP12 é um regulador negativo da imunidade inata envolvido na inibição de NF- κ B. Essa proteína é capaz de interromper as vias de sinalização mediadas por TLR e/ou CD40 impedindo a ativação de NF- κ B (LICH et al., 2007). Essa quebra na sinalização se dá através da interferência em duas quissases essenciais para a via: NIK e IRAK-1. NLRP12 é capaz de induzir a degradação de NIK e de impedir a hiperfosforilação de IRAK-1, mantendo-a em sua forma inativa (YE et al., 2008) e assim bloqueando a ativação de NF- κ B.

2.11 OS INFLAMASSOMOS

O termo inflamassomo foi cunhado inicialmente para descrever um complexo proteico formado por NLRP1, a proteína adaptadora PYCARD e as caspases 1 e 5 (MARTINON et al., 2002). Posteriormente o termo também foi utilizado para estruturas semelhantes envolvendo outras proteínas. Como o nome sugere, esses complexos modulam a resposta inflamatória.

Os inflamassomos atuam no processo inflamatório controlando a atividade de certas caspases. As caspases são cisteína-proteases que iniciam ou desencadeiam processos celulares que podem resultar em resposta inflamatória ou apoptose. Sua atividade celular é, em geral, bastante elevada e rigorosamente controlada, sendo sintetizadas na forma de zimogênios. As principais caspases pró-inflamatórias encontradas em humanos são as caspases 1, 4 e 5 (MARTINON e TSCHOPP, 2007). Dessas, a mais bem caracterizada é a caspase 1, que quando ativa é capaz de promover o processamento da pró-IL-1 β em IL-1 β madura. IL-1 β é um importante mediador pró-inflamatório que é produzido no local de uma lesão ou no sítio de uma infecção e que regula uma ampla gama de funções. Seus efeitos são dependentes de sua concentração. Em baixas concentrações IL-1 β atua como um mediador da inflamação local, recrutando células para o ponto da infecção. Já em quantidades maiores, a IL-1 β atinge a corrente sanguínea e exerce efeitos endócrinos, podendo afetar a regulação térmica e causar febre, por exemplo.

A ativação e liberação de IL-1 β é um processo muito bem regulado e que ocorre apenas quando estimulado, e é aí que entram os inflamassomos. Os inflamassomos são as “máquinas moleculares” que são montadas mediante um sinal, resultando no processamento tanto das caspases como da IL-1 β . A montagem desse complexo se dá através de interações homotípicas, onde domínios semelhantes interagem formando uma espécie de esqueleto proteico que serve como plataforma para a ação catalítica dessas proteínas (Figura 10).

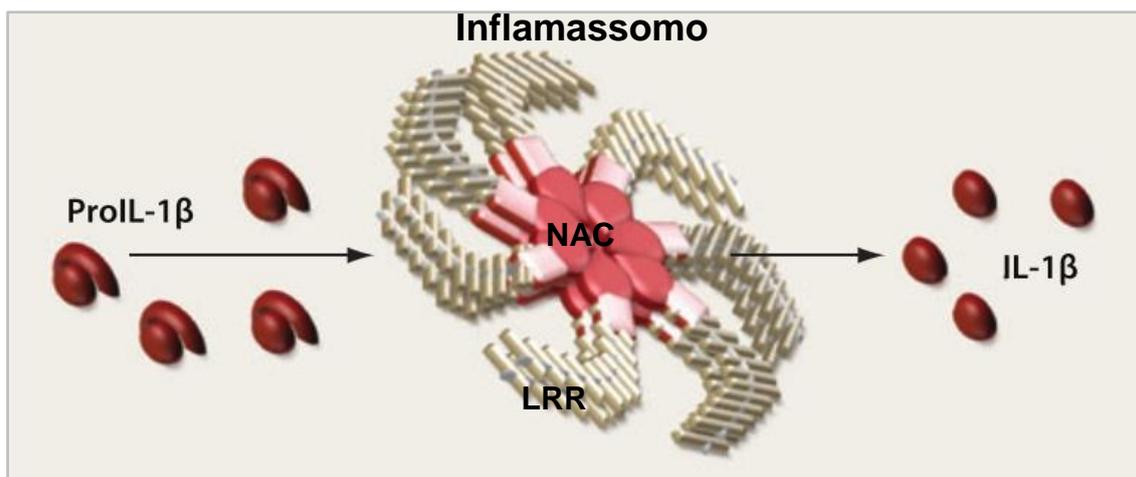


FIGURA 10 – VISÃO TRIDIMENSIONAL DO INFLAMASSOMO. Após um sinal ativador ocorre a oligomerização das proteínas NLR via interações nacht-nacht, seguida pelo recrutamento de capases e proteínas adaptadoras. é provável que o processamento da pró-IL-1 β ocorra voltado para o interior da estrutura. LRR, repetições ricas em leucina; PYD, domínios pirina
 FONTE: MARTINON et al., 2009. Modificado pelo autor.

Entre as principais proteínas capazes de formar inflamassomos estão NLRP1, NLRP3, NLRC4 (também conhecida como IPAF). Essas proteínas formam oligômeros através de interações NACHT-NACHT, e recrutam as pró-caspases por meio de ligações CARD-CARD. As pró-caspases são então clivadas e levam a maturação de interleucinas, tais como IL-1 β e IL-18. Em alguns casos também é necessária à participação de uma proteína adaptadora chamada PYCARD (também conhecida como ASC). Essa proteína é que faz a ponte entre os domínios PYD das proteínas NLR com os domínios CARD presentes nas caspases (Figura 11).

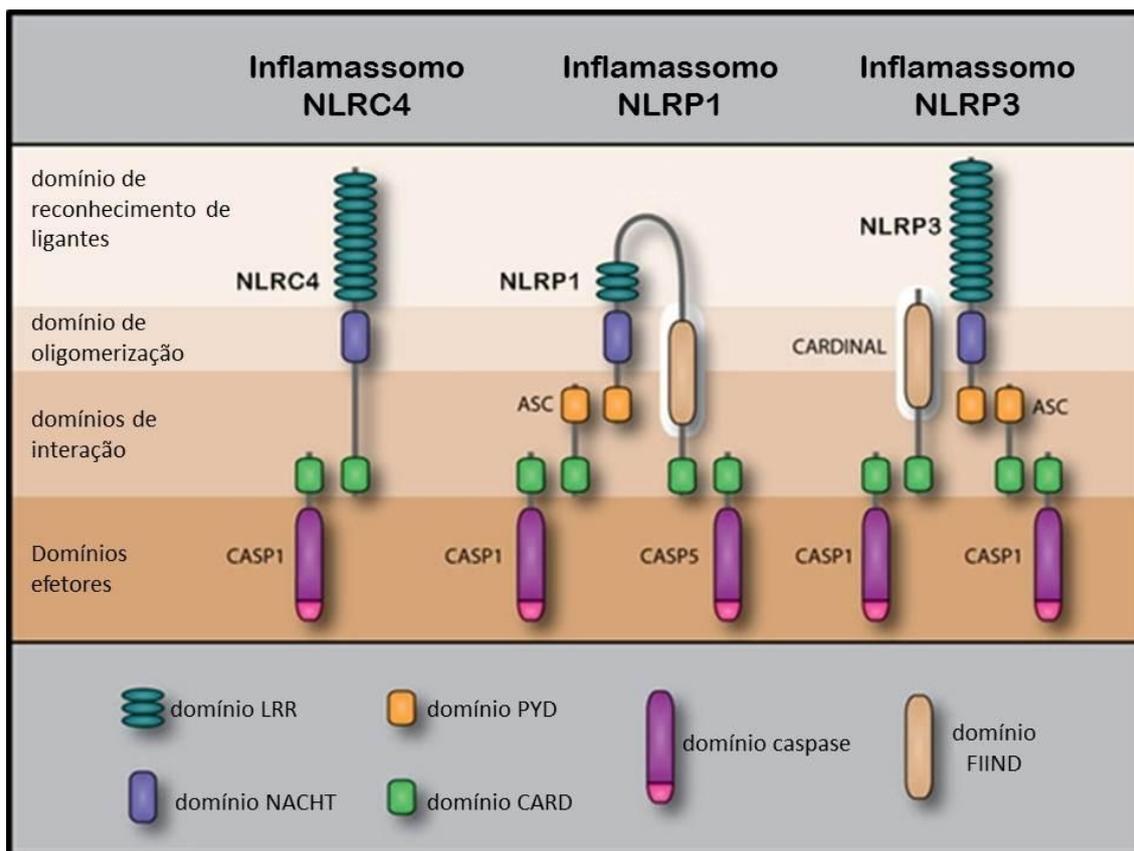
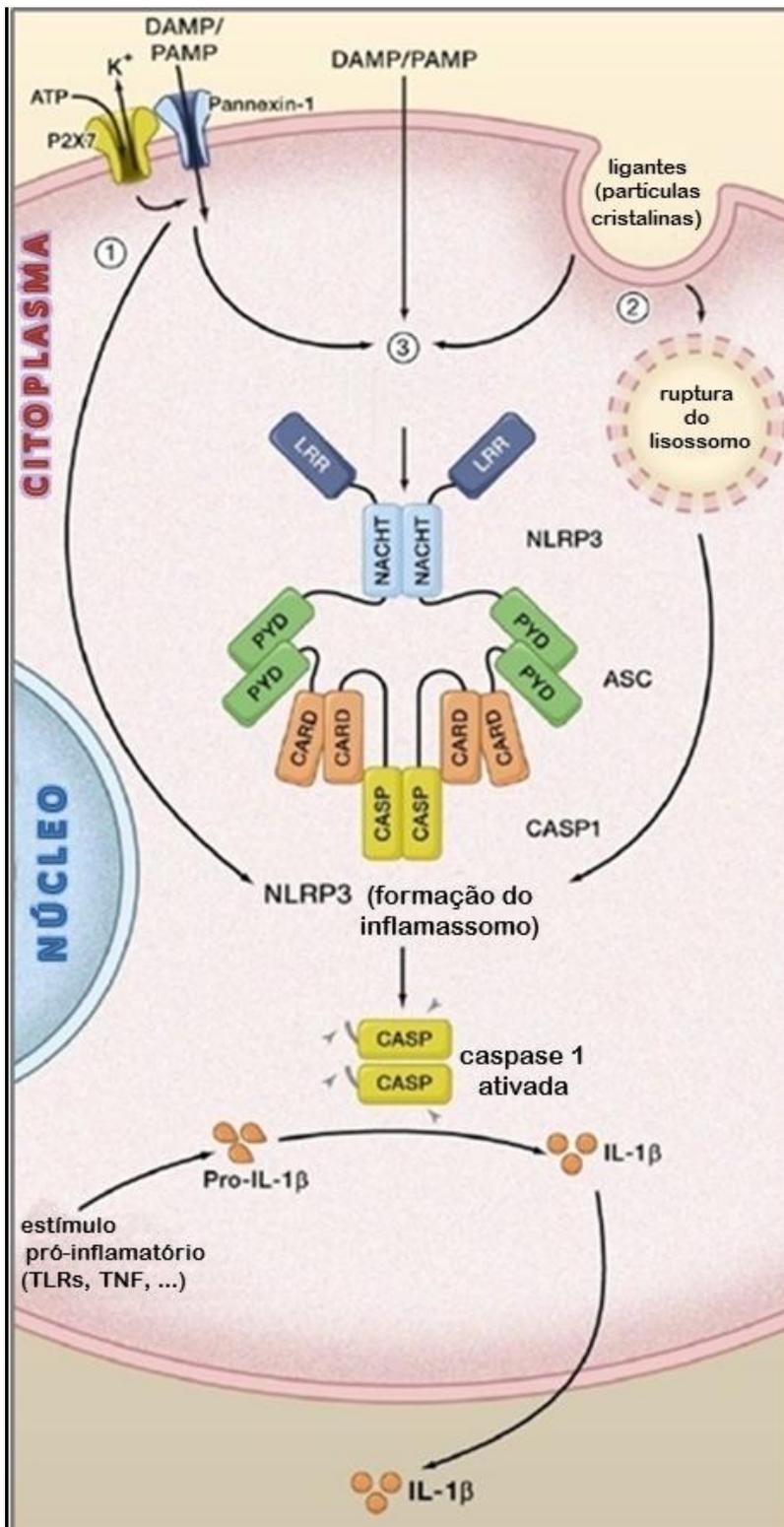


FIGURA 11 – INTERAÇÕES PROTEICAS DO INFLAMASSOMO. Representação esquemática mínima dos principais inflamassomos conhecidos. Notar as interações homotípicas entre as diferentes proteínas envolvidas (SIDIROPOULOS et al., 2008).

Já foi demonstrado que várias moléculas derivadas de patógenos são capazes de ativar os inflamassomos. Entre muitos outros exemplos já descritos na literatura estão o muramil dipeptídeo (MARTINON et al., 2004), RNA dupla fita e RNA viral (KANNEGANTI et al., 2006). Entretanto poucos trabalhos publicados até o momento conseguiram demonstrar uma interação física direta entre os inflamassomos e seus supostos ligantes. Dada a variedade estrutural dos agonistas dos inflamassomos é pouco provável que todos eles sejam reconhecidos dessa forma, e o mecanismo exato pelo qual eles são ativados é bastante controverso. Pelo menos três hipóteses diferentes e não excludentes já foram propostas para elucidar a questão (Figura 12). Uma delas aponta que o ATP extracelular é capaz de provocar o efluxo de potássio intracelular e induzir a formação de poros na membrana plasmática, permitindo a entrada das moléculas ativadoras que então se ligariam de forma direta as proteínas NLR pertinentes, levando a formação dos inflamassomos (KANNEGANTI et al.,

2007). Outra possibilidade levantada é a de que compostos cristalinos tais como urato monossódico, beta-amilóide, sílica e alúmen seriam fagocitados e levariam a danos nos lisossomos, expondo o conteúdo lisossomal que então é de alguma forma detectado pelos inflamassomos, ativando-os (HALLE et al., 2008; HORNUNG et al., 2008). A última das três hipóteses propõe que a ativação dos inflamassomos se dá pela ligação com espécies reativas de oxigênio que seriam produzidas em resposta a certas moléculas, explicando as relações já observadas entre diferentes antígenos e a atividade dos inflamassomos (CRUZ et al., 2007).



pele autor.

FIGURA 12 – PRINCIPAIS HIPÓTESES PARA A ATIVAÇÃO DOS INFLAMASSOMOS. 1) Efluxo de K^+ e formação de poros. 2) Danos lisossomais expondo moléculas ativadoras no citoplasma. 3) Formação de espécies reativas de oxigênio levando a ativação dos inflamassomos
 FONTE: SCHRODER e TSCHOPP, 2010. Modificado

2.12 CIITA E A EXPRESSÃO DE MHC DE CLASSE II

A participação das moléculas MHC de classe II é uma das peças fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta imune específica contra um patógeno. Sua principal função é a de apresentar peptídeos derivados de patógenos extracelulares às células T CD4+, ativando-as. Em geral, a expressão dessas moléculas é restrita a células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas, macrófagos e células B, podendo ser induzida por citocinas (por exemplo, interferon-gama, IFN- γ) em certas células epiteliais e mesenquimais.

Uma característica interessante dos genes que codificam as moléculas MHC de classe II é o seu alto grau de conservação não só em seus exons, mas também em seus promotores. Esses promotores já foram extensivamente estudados e são conhecidas diversas proteínas capazes de se ligar a estas sequências e promover a expressão desses genes, entre elas NF-Y e RFX. Entretanto, a maioria dessas proteínas reguladoras tem expressão constitutiva em praticamente todos os tipos celulares, não explicando o padrão de expressão observado para MHC de classe II. Apenas com a caracterização do fator de transcrição CIITA é que esse panorama ficou mais claro. CIITA é um coativador da expressão dos genes MHC de classe II que atua interagindo com as proteínas que se ligam ao DNA e desencadeando a transcrição.

Ao contrário de NF-Y e RFX, CIITA tem uma expressão restrita, que se correlaciona com precisão com a expressão observada de MHC de classe II (TING e TROWSDALE, 2002). A expressão de CIITA é controlada por quatro promotores distintos, específicos para diferentes células e condições fisiológicas e que produzem isoformas sutilmente diferentes dessa proteína (HARTON e TING, 2000). O promotor I é responsável pela expressão constitutiva de CIITA em células dendríticas. Não se sabe ao certo em que condições o promotor II é ativo. O promotor III é responsável pela expressão constitutiva em células B, e aparentemente pode regular a quantidade de CIITA produzida mediante estimulação com IFN- γ . O promotor IV também é responsivo a IFN- γ e é o responsável pela expressão de CIITA em macrófagos, células endoteliais e fibroblastos.

2.13 Os genes NLRP

Os genes NLRP fazem parte da maior subfamília dos genes NLR, compreendendo quatorze membros que se encontram nos cromossomos 1, 11, 17 e no braço longo do cromossomo 19 no qual existe agrupamento de nove desses genes (Figura 13). Eles codificam proteínas caracterizadas pela presença de um domínio amino-terminal pirina que inicialmente foi identificado em proteínas mediadoras próapoptóticas (HOFMANN, 1999).

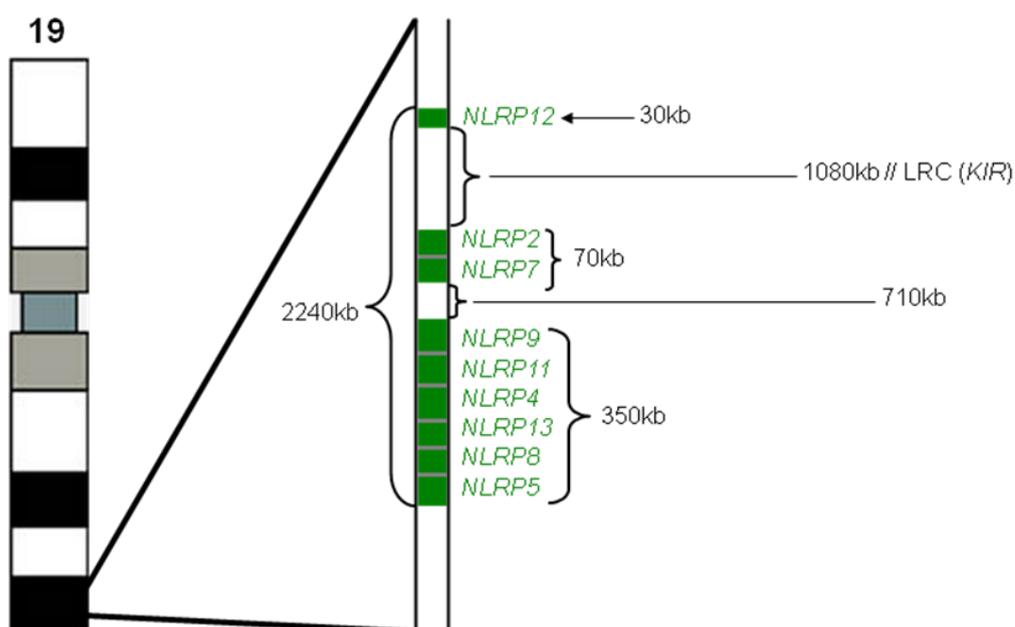


FIGURA 13 – ORGANIZAÇÃO DO AGRUPAMENTO DE GENES NLRP NO CROMOSSOMO 19. Representação esquemática de uma porção do cromossomo 19. Os tamanhos dos segmentos cromossômicos em pares de base estão indicados pelas setas. A figura não está em escala. LRC, *leukocyte receptor complex*; KIR, *killer-cell immunoglobulin-like receptors*.
 FONTE: O autor.

Como as demais proteínas NLR, as proteínas codificadas pelos genes NLRP, apresentam uma estrutura modular, com uma configuração geral de um domínio PYD, um domínio NBD e um domínio LRR (Figura 14).

Outra característica notável é que seus genes apresentam uma forte semelhança de sua estrutura de exons e introns. Em todos os genes NLRP os domínios LRR são codificados por repetições com exatamente 171 pares de

base. A matriz de leitura e as junções exon-intron também são bastante conservadas. Essas particularidades contribuem para o processamento alternativo desses genes sem que haja grande perturbação na estrutura tridimensional da proteína sintetizada, aumentando a plasticidade funcional e possivelmente permitindo a interação com um maior espectro de ligantes (MARTINON e TSCHOPP, 2007).

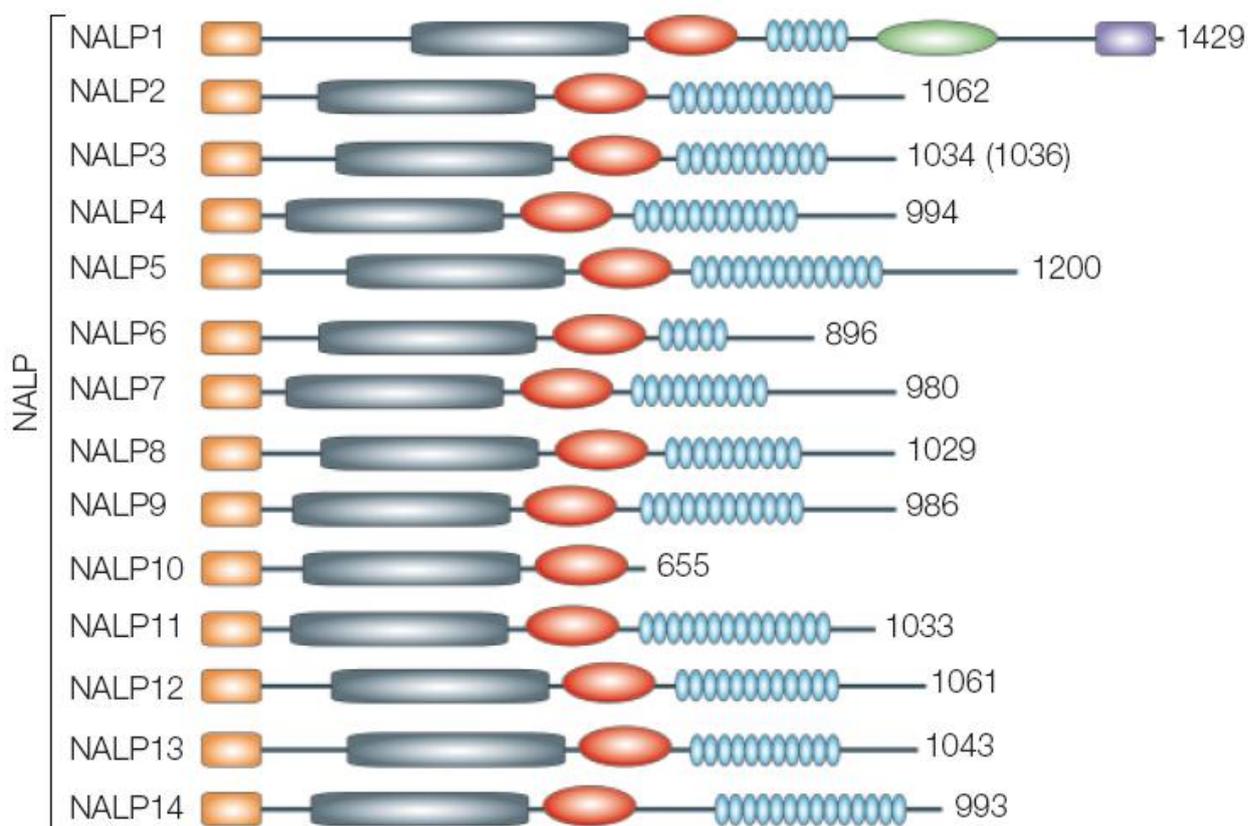


FIGURA 14 – ESTRUTURA GERAL DAS PROTEÍNAS NLRP (NALP). Vale ressaltar a presença de dois domínios adicionais em NLRP1 e a ausência das repetições ricas em leucina em NLRP10. Em laranja o domínio pirina, em cinza o domínio de ligação a nucleotídeos (NACHT), em vermelho o domínio NAD (cuja função é desconhecida), em azul claro o domínio de repetições ricas em leucina, em verde o domínio FIIND (*function to find*, também de função desconhecida) e em roxo o domínio recrutador de caspase. Os números à direita indicam o número de aminoácidos da proteína

FONTE: TSCHOPP et al., 2003. Modificado pelo autor.

A expressão dos genes NLRP ainda não foi totalmente explorada. Para a maioria dos membros dessa subfamília não há estudos detalhados investigando como esses genes são regulados ou em que tecidos ou populações celulares eles estão presente. Já foi verificado que *NLRP1* é amplamente expresso, incluindo os mais diversos tecidos, como neurônios e

testículos (KUMMER et al., 2007). Já *NLRP3* apresenta um padrão mais restrito, com expressão detectada em células do sistema imune, células epiteliais e osteoblastos (MCCALL et al., 2008). Outro fato intrigante é a expressão observada de um grande número de genes NLRP em células germinativas e embriões, levantando um possível papel funcional para esses genes no processo reprodutivo e no desenvolvimento embrionário (ZHANG et al., 2008). A expressão de *NLRP12* é objeto de estudo desse trabalho e será discutida na sequência.

2.14 O GENE *NLRP12*

Curiosamente o gene *NLRP12* foi descrito em três momentos diferentes por três grupos de pesquisa independentes e com objetivos distintos. Esse gene foi primeiramente identificado através da técnica de PCR subtrativa, enquanto se procurava por genes induzidos por óxido nítrico em cultura de células leucêmicas. Ele foi chamado de RON (regulado pelo óxido nítrico). Análises de *northern blot* revelaram um transcrito de cerca de 3kb que se expressava em células polimorfonucleares e monócitos (SHAMI et al., 2001). Posteriormente, procurando por homólogos do gene PYPAF em sequências disponíveis em bancos de dados, chegou-se num gene que supostamente codificaria uma proteína com 1061 aminoácidos. Esse gene foi chamado de PYPAF7 e análises de *northern blot* demonstraram sua expressão em leucócitos de sangue periférico, com pouca ou nenhuma expressão em outros 75 tecidos e linhagens celulares estudados (WANG et al., 2002). Finalmente, buscando por homólogos do gene CIITA, um terceiro grupo de pesquisa chegou a um gene, então chamado de Monarch-1, que codificava uma proteína de 1063 aminoácidos (WILLIAMS et al., 2003). Apenas após algum tempo é que se verificou que todos eles eram na verdade o mesmo gene. Apenas em 2008, com padronização da nomenclatura da família NLR é que ele passou a ser designado como *NLRP12*. Estruturalmente esse gene não apresenta maiores particularidades quando comparado aos demais genes da subfamília NLRP (Figura 15), codificando 12 motivos LRR.

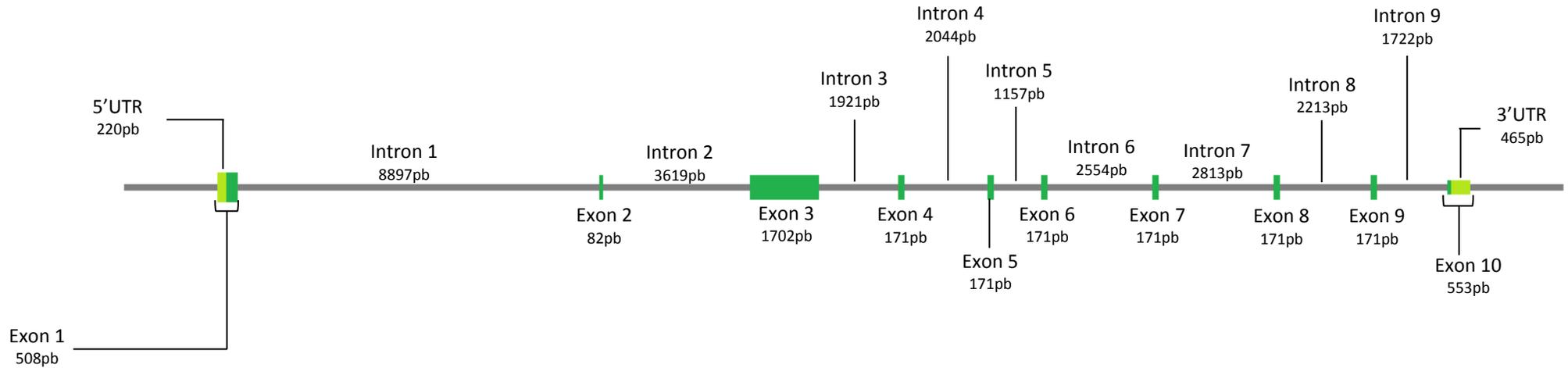


FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO EM ESCALA DO GENE *NLRP12*. A linha em cinza representa o DNA genômico e as caixas em verde os exons do gene *NLRP12*. O tamanho dos exons e introns está representado em pares de base (pb).
FONTE: O autor.

A expressão de NLRP12 já foi verificada em células de medula óssea, linfócitos de sangue periférico (SHAMI et al., 2001), em eosinófilos e em monócitos (WANG et al., 2002). Também foi observado um aumento na expressão de NLRP12 em linfócitos CD4⁺ pacientes de pênfigo foliáceo quando comparados a indivíduos controle (MALHEIROS, 2009). Em conjunto os achados apontam um perfil de expressão bastante restrito e ligado a células de origem mielóide.

Já foram caracterizados dois transcritos primários do gene *NLRP12*, um transcrito longo e um mais curto. O transcrito longo pode sofrer processamento alternativo, resultando num RNA completo, ou em outras três variantes nas quais está ausente pelo menos um dos exons que codificam parte dos motivos LRR (WILLIAMS et al., 2003). A transcrição da forma mais curta acontece a partir de um segundo ponto de início e é bastante diferente das demais, consistindo em um RNA no qual não estão representados os exons que codificam o domínio PYD, o domínio NDB e um dos exons que codifica parte dos motivos LRR (Figura 16).

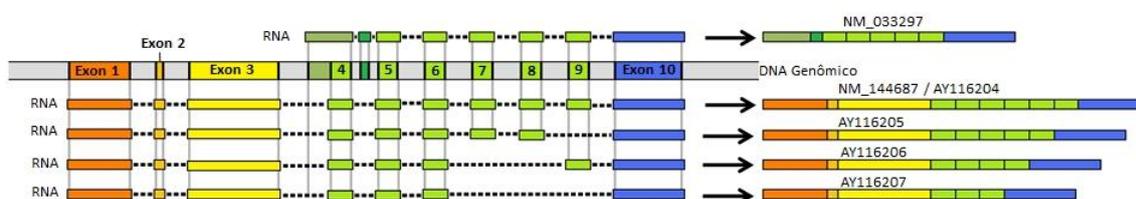


FIGURA 16 – DIAGRAMA DAS ISOFORMAS DE TRANSCRITOS DO GENE *NLRP12*.

2.15 DOENÇAS E A FAMÍLIA NLR

A importância funcional da família gênica NLR é ressaltada por uma série de distúrbios associados a mutações raras e a polimorfismos encontrados nesses genes.

NOD2 está associado a diversas condições, entre elas a doença de Crohn e a síndrome de Blau (MICELI-RICHARD et al., 2001; OGURA, 2003; HAMPE et al., 2001; HAMPE et al., 2002).

Diferentes mutações no gene *CIITA* são responsáveis pela síndrome do linfócito nu, condição em que uma imunodeficiência severa é observada devido à falta de moléculas MHC de classe II (REITH E MACH, 2001). Um polimorfismo localizado no promotor III do gene *CIITA* também já foi associado a diferentes doenças, tais como artrite reumatoide (SWANBERG et al., 2005) e doença autoimune de Addison (GHADERI et al. 2006).

Mutações em *NLRP12* provocam a síndrome autoinflamatória ao frio familiar, também chamada de urticária ao frio (ou FCAS). Trata-se de uma doença monogênica rara autossômica dominante (por haploinsuficiência). Ela pode ser causada por duas mutações distintas que resultam ou em uma alteração de aminoácido ou em uma mudança de matriz de leitura, ambas alterando a estrutura da proteína *NLRP12*. A manifestação da doença consiste em urticária, febre e inflamação sistêmica, sendo que os ataques são sempre provocados por exposição generalizada ao frio. Pode ainda haver complicações como perda de audição. Os estudos realizados apontam para uma perda de função das proteínas mutadas, sendo essas incapazes ou ineficientes na atuação na sinalização da via envolvendo NF- κ B (JÉRU et al., 2008).

Mutações no gene *NLRP3* estão associadas a uma série de distúrbios autoinflamatórios como a síndrome de Muckle-Wells e a síndrome crônico-infantil-neurológica-cutânea-articular (DODÉ et al., 2002; HOFFMAN et al., 2001), além de doenças autoimunes como diabetes mellitus tipo 1 (CROVELLA et al., 2010) e doença celíaca (CROVELLA et al., 2011). Já *NLRP1* parece estar implicado em um conjunto de doenças autoimunes associadas ao vitiligo (JIN et al., 2007), doença auto imune de Addison (NOWAK, et al., 2010).

A participação de genes *NLRP* na imunidade adaptativa e possivelmente na autoimunidade é amplamente aceita na literatura (MARTINON et al., 2009). Entretanto, as doenças mais bem estudadas envolvendo esses genes consistem doenças infecciosas ou em síndromes autoinflamatórias que não apresentam células T autorreativas, nem anticorpos autorreativos. Isso torna necessária uma melhor compreensão do papel desses genes tanto na imunidade inata como na adaptativa.

3 HIPÓTESES

As hipóteses de trabalho do presente projeto podem ser enumeradas da seguinte forma:

- I. O gene *NLRP12* está associado ao pênfigo foliáceo e a diferença de expressão observada entre pacientes e indivíduos controle é uma das causas dessa associação.
- II. A expressão de isoformas do gene *NLRP12* varia entre pacientes de pênfigo foliáceo, de pênfigo vulgar e indivíduos controle; e essa variação é relevante para a doença.
- III. Polimorfismos do gene *NLRP12* estão associados ao pênfigo foliáceo. Essa associação decorre de alterações qualitativas e/ou quantitativas na função desse gene, que resultam em alterações na regulação do fator de transcrição NF- κ B.
- IV. Polimorfismos dos genes *NLRP1* e *NLRP3* estão associados ao pênfigo foliáceo. Essa associação decorre de alterações na função desses genes, que resultam na produção anormal de mediadores inflamatórios, tais como IL1- β , que estão presentes em pacientes de pênfigo.
- V. Polimorfismos do gene *CIITA* estão associados ao pênfigo foliáceo. Essa associação decorre de alterações na função desse gene, que resultam na expressão diferenciada de genes HLA de classe II implicados na patogênese do pênfigo foliáceo.

4 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Apesar dos diversos estudos já realizados, o conhecimento sobre os fatores genéticos implicados no pênfigo foliáceo não é completo, uma vez que essa é uma doença complexa, em que vários genes estão atuando em conjunto com fatores ambientais. Tendo em vista a diferença de expressão do gene *NLRP12* entre linfócitos T CD4⁺ de pacientes de pênfigo foliáceo e indivíduos controle (MALHEIROS, 2009) e seu envolvimento em vias imunológicas ainda pouco exploradas, podemos considerá-lo como um gene potencialmente envolvido nessa doença. Entretanto, para que se compreenda sua real relevância na patogênese do pênfigo foliáceo são necessários mais estudos, avaliando tanto o seu polimorfismo como sua expressão.

O conhecimento atual sobre as funções de *NLRP12* e o seu envolvimento em outras patologias ainda é incipiente, assim como as informações sobre o papel dos genes NLR, de uma forma geral, no processo de autoimunidade. Desse modo, a análise de outros genes da família NLR também é pertinente. Tanto *NLRP1* e *NLRP3* quanto *CIITA* se destacam como bons candidatos. O padrão de expressão de *NLRP1* e *NLRP3* e seu envolvimento na produção de mediadores inflamatórios são concordantes com o que se conhece sobre a patofisiologia do pênfigo foliáceo, com *NLRP1* sendo expressos em células de Langerhans e *NLRP3* em queratinócitos. Além disso, também foi evidenciada a participação desses genes em outras doenças autoimunes. Já *CIITA* é um dos principais fatores de transcrição de genes MHC de classe II, que apresentam uma importante associação com pênfigo foliáceo.

Nesse contexto, estudos caso-controle envolvendo a análise de genes candidatos se tornam relevantes, contribuindo para uma maior compreensão da situação, ajudando a completar algumas das lacunas sobre o que se sabe tanto sobre a doença como sobre os genes estudados. Considerando o que foi exposto, os objetivos desse trabalho são:

Específicos:

- I. Verificar a existência de associação entre polimorfismos do gene *NLRP12* e o pênfigo foliáceo
- II. Avaliar a expressão de diferentes isoformas do gene *NLRP12* em pacientes de pênfigo foliáceo, pênfigo vulgar e em indivíduos controle.
- III. Verificar a existência de associação entre polimorfismos dos genes *NLRP1* *NLRP3* e *CIITA* e o pênfigo foliáceo

Gerais:

- IV. Compreender a possível causa da expressão diferencial de *NLRP12*, constatada em estudo anterior e os mecanismos subjacentes a essa.
- V. Obter informações que auxiliem a compreensão da patofisiologia do pênfigo foliáceo.

5 ARTIGO

CIITA PROMOTER POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY TO PEMPHIGUS FOLIACEUS

Bruno Zagonel Piovezan¹, Maria Luiza Petzl-Erler¹

¹ Human Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

5.1 ABSTRACT

The NLR protein family (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing) is characterized by soluble intracellular molecules with a nucleotide-binding domain and leucine rich-repeats that are involved in immunity. In the present study the polymorphism of four NLR genes - *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP12* and *CIITA* – were investigated for association with pemphigus foliaceus, an organ-specific autoimmune blistering disease. While *NLRP1*, 2 and 12 are related with processes like cytokine maturation and NF- κ B regulation, *CIITA* is a major transcription factor of MHC class II genes. It interacts with a regulatory proteins and coordinates MHC class II expression being crucial for both, constitutive and IFN- γ induced expression of these molecules in antigen-presenting cells. Eight single nucleotide polymorphisms in these genes were analyzed in 252 pemphigus foliaceus patients and 209 controls. One of the *CIITA* promoter SNPs, rs3087456 or -168A>G, was associated with altered susceptibility for the disease with allele G being significantly over-represented in the patients group, the G/G genotype being the most susceptible (OR=2.59, $p < 10^{-3}$ and OR=1.96, $p < 10^{-3}$ for genotypes G/G and G/A relative to genotype A/A, respectively). The SNP rs3087456 is located in the *CIITA* promoter and is known to impact its function, with the genotype G/G expressing lower levels of *CIITA* and MHC class II molecules. We conclude that genetically determined lower levels of *CIITA* is one of the factors resulting in increased susceptibility to pemphigus foliaceus.

Keywords: NLR family, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP12*, *CIITA*, MHC class II, pemphigus foliaceus

5.2 INTRODUCTION

Pemphigus foliaceus is an organ-specific autoimmune blistering disease that is characterized by the presence of autoantibodies against desmoglein 1, an epidermal cell-adhesion glycoprotein found in the desmosomes. Skin blisters characteristic of the disease are a result of the loss of adhesion between keratinocytes, a process known as acantholysis. *Pemphigus foliaceus* has an endemic form found in South America (also called *fogo selvagem*, meaning wild fire in Portuguese). This form has similar immunological and histological features to the sporadic one, but its incidence is much higher in endemic areas than in other regions. *Pemphigus foliaceus* etiology is not fully understood, but epidemiologic and genetic data point towards a model in which in a genetically susceptible individual is exposed to an environmental agent that triggers pathologic autoreactivity.

To date, important genetic associations between *pemphigus foliaceus* and *MHC class II* (PAVONI, et al., 2003; PETZL-ERLER and SANTAMARIA, 1989) genes and *CD40L* (MALHEIROS and PETZL-ERLER, 2009) have been found with. Polymorphisms of other genes such as *IL4*, *IL6*, *IL10*, *PDCD1*, *CD86*, *CD40* and *BLYS* have also been associated to *pemphigus foliaceus*, but in a weaker degree (BRAUN-PRADO and PETZL-ERLER, 2007; DALLA-COSTA et al., 2010; MALHEIROS and PETZL-ERLER, 2009; PEREIRA et al., 2004). No association was observed between *TNF*, *LTA*, *DSG1*, *BAX*, *TP53*, *CD28*, *CD80* and *CD19* polymorphisms and *pemphigus foliaceus* (DALLA-COSTA, et al., 2010; KÖHLER and PETZL-ERLER, 2006; MALHEIROS and PETZL-ERLER, 2009; PETZL-ERLER and MALHEIROS, 2005; ROXO et al., 2003). Though, as the genetic component of *pemphigus foliaceus* is polygenic, analysis of other genomic regions and gene families is necessary to the better comprehension of the disease. NLR (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing) is a protein family constituted by soluble intracellular molecules with a nucleotide-binding domain and leucine rich-repeats. There are five NLR subfamilies distinguishable by their N-terminal domain. NLRP is the largest subfamily and it is characterized by the presence of a pyrin domain. Their members can sense conserved microbial products and metabolic stress, assembling high molecular weight complexes called inflammasomes, that activates proinflammatory caspases resulting in maturation of some cytokines (such as IL-1 β and IL-18) (for a review see (MARTINON, MAYOR, and TSCHOPP, 2009)). The NLRP1 inflammasome was the first described and along with NLRP3 they are the better understood ones. They have been implied in several diseases, like vitiligo-associated multiple autoimmune disease (JIN et

al., 2007), familial cold autoinflammatory syndrome (DODÉ et al., 2002; HOFFMAN et al., 2001), and Muckle-Wells syndrome (DODÉ et al., 2002; HOFFMAN et al., 2001). Contrasting with the activating functions of other NLRP members, NLRP12 is a negative regulator of immunity, that suppresses NF- κ B activation (LICH et al., 2007) interfering in its activation cascade (YE et al., 2008). This gene expresses at least five different isoforms (WILLIAMS et al., 2003), but functional relevance of these variants is not clear

CIITA (class II, major histocompatibility complex, transactivator) is the single member of the NLRA subfamily and it is characterized by the presence of an acidic transactivator domain. CIITA is the major transcription factor of *MHC class II* genes, interacting with a large set of regulatory proteins. It coordinates *MHC class II* expression and it is crucial for both, constitutive and IFN- γ induced expression of these molecules in antigen-presenting cells. Mutations in this gene are responsible for the bare lymphocyte syndrome, a severe immunodeficiency in which individuals fail to produce MHC class II molecules.

Here, the possible involvement of *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP12*, *CIITA* polymorphism and *NLRP12* expression with the susceptibility to pemphigus foliaceus was investigated in a Brazilian population. A total of eight single nucleotide polymorphisms (SNP) in these four genes were analyzed and the NLRP12 mRNA isoforms were characterized in peripheral blood mononuclear cells and CD4⁺ T cells.

5.3 SUBJECTS AND METHODS

5.3.1 Population samples

In this study, 252 unrelated patients with pemphigus foliaceus and 209 controls without history of the disease were analyzed. The patients were diagnosed based in clinical and immunohistochemical criteria and were contacted at Hospital Adventista do Pênfigo, in Mato Grosso do Sul state (n=210); Hospital de Dermatologia Sanitária, Paraná state (n=21), and Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo state (n=21). The control sample was contacted mainly at Hospital Adventista do Pênfigo and surroundings (n=205) and Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (n=4).

Due to possible differences in allele frequencies among populations, patients and controls were classified according to ancestry and paired in two groups: the Euro-

Brazilians, with predominantly European ancestry; and the Afro-Brazilians, with mixed ancestry, predominantly African and European.

For the analyses of *NLRP12* RNA, our sample was of 21 patients with pemphigus foliaceus, 6 patients with pemphigus vulgaris and 59 controls without history of the disease. The patients were diagnosed based on clinical and immunohistochemical criteria. They were contacted at Hospital Adventista do Pênfigo, Campo Grande, Mato Grosso do Sul state and at Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), Ribeirão Preto, São Paulo state. The control sample also includes individuals from Curitiba, Paraná state.

Written informed consent was obtained from all participants. This study has received the approval of the Human Research Ethics Committee, in accordance with Brazilian federal laws.

5.3.2 Nucleic acids purification

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by standard salting out or phenol/chloroform methods. RNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and CD4⁺ T lymphocytes with silica-membrane mini spin columns (RNeasy kit, Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA extractions were followed by reverse transcriptions to cDNA (High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems).

5.3.3 Genotyping

Eight SNPs located in four different *NLR* genes were selected (table 1). All of them were genotyped through the SNPlex™ System (Applied Biosystems). This system consists in the oligonucleotide ligation assay (OLA) combined with a multiplex PCR and capillary electrophoresis to achieve allelic discrimination (TOBLER et al., 2005).

5.3.4 NLRP12 expression assay

In order to identify the different *NLRP12* messenger RNAs we performed a PCR using primers that hybridize in regions common to all isoforms, flanking the variable segment (5' ACACCCCAACTGCAAACCTTC 3'; 5' AGAGCCAGCAGATAGGACCA 3'). The amplification was followed by agarose gel electrophoresis (1.5%, 1:30h, 90V) and ethidium bromide staining (20µg/ml). The isoforms were visually identified based on their known sizes.

5.3.5 Statistical analysis

Allelic, genotypic and allele carrier frequencies were obtained by direct counting. Haplotype frequencies were obtained after inference of the gametic phase for SNPs located in the same chromosome using the ELB algorithm implemented in the ARLEQUIN v3.11 software package (EXCOFFIER, LAVAL, and SCHNEIDER, 2005). The same software was used to test for the Hardy-Weinberg equilibrium by Guo and Thompson's method (GUO and THOMPSON, 1992).

To check if Afro- and Euro-Brazilians differed, their allelic and genotypic frequencies for each locus were compared. The population differentiation testes were made using 2x2 contingency tables, estimating exact *p*-values via the metropolis algorithm (MILLER, 1997).

For the association analysis between pemphigus foliaceus disease status and the polymorphisms analyzed, odds ratio (OR) and the 95% confidence intervals (CI) were calculated by the Mantel-Haenszel method (MANTEL and HAENSZEL, 1959) and exact *p*-values via the metropolis algorithm (MILLER, 1997). Association analyses were done for the Afro- and the Euro-Brazilian samples separately and for the total population sample. When a significant difference between the allele frequencies of Afro- and Euro-Brazilians was detected for a given locus, then the proportions of Afro- and Euro-Brazilians in the total population sample were adjusted, in order to attain similar ancestry for both the patient and the control groups. In this situation, the total population sample is smaller than the simple sum of the Euro- and the Afro-Brazilian population samples.

5.4 RESULTS

5.4.1 Association analyses

No significant difference between patients and controls were observed when comparing the allele and genotype frequencies of the individual SNPs in *NLRP1* (rs12150220), *NLRP3* (rs10754558 and rs10802501) and *NLRP12* (rs4419163, rs34971363 and rs10410581) (table 2 and figure 1; supplementary tables 1-7). The same is true for the *NLRP3* and *NLRP12* haplotypes (results not shown).

For all the SNPs analyzed, no significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium frequencies were noticed for both the patient and the control samples.

Of the two SNPs analyzed in *CIITA* (rs3087456 and rs4774), the one located at the promoter region (rs3087456) was significantly associated with pemphigus foliaceus. The G allele frequency was significantly increased in patients (table 3). Both homozygosity and heterozygosity for the G allele, as assessed by the OR, result in increased disease risk, in comparison to the A/A genotype (table 3 and figure 2). Because the OR of the G/A genotype is intermediate to both homozygotes, the most likely allelic interaction is incomplete dominance, with the A/A genotype having the lowest risk.

Significant association was observed in the total sample and in the Euro-Brazilian stratum. For the Afro-Brazilians a similar pattern was observed, however, statistical significance was not reached (figure 3).

The haplotypes formed by the two SNPs analyzed in this gene also differed among patients and controls (data not shown). Linkage disequilibrium was low ($D' = 0.2727$, $r^2 = 0.0366$, $p < 0.01$) and the the SNP rs3087456 alone can account for the differences of haplotype frequencies.

5.4.2 NLRP12 gene expression

For comprehension of *NLRP12* gene expression and its possible involvement in pemphigus, we determined the different transcripts and alternative splicing forms that were present in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and CD4⁺ T lymphocytes in both patients and healthy controls. For simplicity the isoforms were named here based on the number of LRR coding exons, R3, R4, R5, and R6 (accession numbers AY116207,

AY116206, AY116205, AY116204, respectively) or size, S (for short, accession number NM_033297).

Concerning the RNA from PBMC, no significant difference was observed among individuals. The isoforms R3, R4, R5, and R6 were always present, with just 3 of the 59 control individuals and none of the patients missing the S form. Differently from the PBMC, the expression of *NLRP12* in CD4⁺ T lymphocytes varied greatly, though no pattern distinguishing between the patient and control groups was detected. No *NLRP12* expression was observed in 22% of the patients (6 out of 27) and in 33% of the controls (3 out of 9). The other individuals presented from one to all isoforms. The expression profile of CD4⁺ T lymphocytes can be seen in figure 4.

5.5 DISCUSSION

NLR genes play an important role in immunity in different ways. In this study four candidate genes from this family with dissimilar functions, including the control of gene expression (*CIITA*), NF- κ B inhibition (*NLRP12*) and cytokine activation (*NLRP1* and *NLRP3*), were considered.

One SNP (rs3087456, also known as -155A>G or -168A>G) located in the *CIITA* gene promoter was found to be associated to pemphigus foliaceus susceptibility. *CIITA* is a master regulator of MHC class II gene expression and its expression precisely parallels MHC class II synthesis, being necessary for constitutive and IFN- γ induced expression of these molecules in antigen-presenting cells (reviewed in (TING and TROWSDALE, 2002)). In pemphigus, the interaction between the T cell receptor and classical MHC class II molecules is crucial for activation of desmoglein-specific B cells and secretion of autoantibodies (NISHIFUJI et al., 2000).

The association was detected in the total sample and in Euro-Brazilians. Although lacking statistical significance, we also observed an increase of the frequency of allele G in Afro-Brazilians when compared to their respective controls. The lack of significance may be due to low statistical power, as this population sample was smaller than the Euro-Brazilian one and the allele and genotype frequencies differed less between the Afro-Brazilian patients and controls than between the Euro-Brazilian patients and controls.

CIITA gene expression is regulated in a complex fashion. It has four promoters which are responsible for its expression in different cell types (HARTON and TING, 2000). The SNP rs3087456 is located at promoter III, responsible for *CIITA* constitutive

expression in B cells. It has been shown that this polymorphism can affect promoter III functionality. When peripheral blood cells from different individuals were stimulated *ex vivo* with IFN- γ , the ones with genotype G/G had lower levels of *C/ITA* and MHC class II mRNA than genotypes A/A and A/G (SWANBERG et al., 2005).

For rheumatoid arthritis (SWANBERG et al., 2005) and Addison's disease (GHADERI et al., 2006), the frequency of rs3087456 allele G was higher in patients than in controls. Considering that the interaction between antigenic epitopes associated to MHC class II molecules and the T cell receptor is necessary for the development of autoimmunity, this observation leads us to suggest that higher expression of the MHC class II alleles associated to higher susceptibility to the disease (PAVONI et al., 2003) has not a major effect on susceptibility. Thereafter, there are at least two not mutually exclusive possible explanations, for the association: (i) higher levels of MHC class II molecules protect against the disease, or (ii) lower levels of MHC class II molecules promote the disease. In fact some *HLA-DRB1* alleles are associated with decreased risk of pemphigus foliaceus (e.g., *DRB1*07:01*, OR=0.09, $p < 10^{-6}$; *DRB1:03:01*, OR=0.23, $p < 10^{-3}$) (PAVONI et al., 2003). So it is reasonable to think that higher levels of these molecules or of other protective MHC class II molecules associated to them (e.g., HLA-DQ2, whose beta chain is encoded by *DQB1*02* alleles in strong linkage disequilibrium with *DRB1*07:01* and with *DRB1:03:01*) help to prevent the disease. On the other hand, lower levels of MHC class II molecules may result in less efficient antigen presentation to regulatory T cells (Treg), a specialized population of T cells that can suppress the activation of the antigen-specific immune responses, helping to maintain homeostasis and inducing tolerance to self-antigens. Actually, forkhead box P3 (*FOXP3*) gene, a typical Treg marker, is up-regulated in lesional skin compared to uninvolved skin of pemphigus foliaceus patients and it has been proposed that these cells are insufficient and/or inefficient to control the autoimmune response in the susceptible individuals, resulting in activation and expansion of pathogenic T cells (Malheiros et al., manuscript submitted). Moreover, the proportion of these cells among peripheral blood mononuclear cells of pemphigus vulgaris patients is decreased and they have approximately ten times less Treg cells than healthy controls (SUGIYAMA et al., 2007). Thus, impairment in Treg function can also explain the rs3087456 association.

The other polymorphism analyzed in *C/ITA*, the rs4774 SNP, it is not associated with pemphigus foliaceus susceptibility. This SNP predicts an amino acid change (from glycine to alanine) in the nucleotide binding domain of the protein. Until now, no significant association between this SNP and any autoimmune disease has been reported. Therefore,

we conclude that it does not have a major effect on the structure of the CIITA molecule with no significant functional consequence.

None of the *NLRP* genes analyzed - *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP12* - were associated with differential susceptibility to pemphigus foliaceus. Thus far, *NLRP* genes and their products have been related especially to autoinflammatory syndromes, without the involvement of reactive T cells or autoantibodies (MARTINON, MAYOR, and TSCHOPP, 2009). However, there are enough evidences that could link these genes to pemphigus: they are expressed in lymphocytes, Langerhans cells and keratinocytes (KUMMER et al., 2007); they are associated to other autoimmune conditions (JIN et al., 2007); IL-1 β , a cytokine regulated by NLR inflamassomes, is found at high levels in sera of pemphigus foliaceus patients (ROCHA-RODRIGUES et al., 2003) and could be important in the acantholysis processes. Therefore, we cannot rule out the involvement of the products of these genes in pemphigus pathogenesis and it might be of interest to evaluate other polymorphisms in these genes and other members of the NLR gene family.

No clearcut difference between patients and controls was observed concerning *NLRP12* gene expression. The high variation found in CD4⁺ T may be due to this gene's regulation resulting in different isoforms depending on the physiological situation. Moreover, this variation can be, at least in part, explained by the presence of various subpopulations of CD4⁺ T cells that are in different stages of differentiation or activity.

In conclusion, we show here that the SNP rs3087456 located in the *CIITA* gene promoter is associated with pemphigus foliaceus and suggest that the association results from interaction between the genetically controlled levels of CIITA and their effect on the expression of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 molecules associated to pemphigus foliaceus.

5.6 REFERENCES

PETZL-ERLER, M.L.; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, v. 33, n. 3, p. 408-14, 1989.

PAVONI, D.P.; ROXO, V.M.M.S.; MARQUART FILHO, A.; PETZL-ERLER, M.L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 2, p. 110-6, 2003

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M.L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 6, p. 547-58, 2009.

PEREIRA, N.F.; HANSEN, J.A.; LIN, M-T.; ROXO, V.M.M.S.; BRAUN, K.; PETZL-ERLER, M.L. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, n. 6, p. 233-41, 2004.

BRAUN-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M.L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 547-58, 2007

DALLA-COSTA, R.; PINCERATI, M.R.; BELTRAME, M.H.; MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M.L. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 71, n. 8, p. 809-17, 2010.

ROXO, V.M.M.S.; PEREIRA, N.F.; PAVONI, D.P.; LIN, M-T.; HANSEN, J.A.; POERSCH, C.O.; FILHO, A.M.; PETZL-ERLER, M.L. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus - are there any associations? **Tissue Antigens**, v. 62, n. 5, p. 394-400, 2003.

PETZL-ERLER, M.L.; MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? **Journal of Autoimmunity**, v. 25, n. 2, p. 121-5, 2005.

KÖHLER, K.F.; PETZL-ERLER, M.L. No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, n. 2, p. 141-4, 2006.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 229-65, 2009.

JIN, Y.; MAILLOUX, C.M.; GOWAN, K.; RICCARDI, S.L.; LABERGE, G.; BENNETT, D.C.; FAIN, P.R.; SPRITZ, R.A. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 356 n. 12 p. 1216-25, 2007.

HOFFMAN, H.M.; MUELLER, J.L.; BROIDE, D.H.; WANDERER, A.A.; KOLODNER, R.D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nature Genetics**, v. 29, n. 3, p. 301-5, 2001

DODÉ, C.; LE DÛ, N.; CUISSET, L.; LETOURNEUR, F.; BERTHELOT, J.-M.; VAUDOUR, G.; MEYRIER, A.; WATTS, R.A.; SCOTT, D.G.I.; NICHOLLS, A.; GRANEL, B.; FRANCES, C.; GARCIER, F.; EDERY, P.; BOULINGUEZ, S.; DOMERGUES, J-P.; DELPECH, M.; GRATEAU, G. New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 6, p. 1498-506, 2002.

LICH, J.D.; WILLIAMS, K.L.; MOORE, C.B.; ARTHUR, J.C.; DAVIS, B.K.; TAXMAN, D.J.; TING, J.P-Y. Monarch-1 suppresses non-canonical NF-kappaB activation and p52-dependent chemokine expression in monocytes. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 3, p. 1256-60, 2007.

YE, Z.; LICH, J.D.; MOORE, C.B.; DUNCAN, J.A.; WILLIAMS, K.L.; TING, J.P-Y. ATP binding by monarch-1/NLRP12 is critical for its inhibitory function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 5, p. 1841-50, 2008.

[WILLIAMS, K.L.; TAXMAN, D.J.; LINHOFF, M.W.; REED, W.; TING, J.P-Y. Monarch-1: a pyrin/nucleotide-binding domain/leucine-rich repeat protein that controls classical and nonclassical MHC class I genes. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 11, p. 5354-8, 2003.

TOBLER, A.R.; SHORT, S.; ANDERSEN, M.R.; PANER, T.M.; BRIGGS, J.C.; LAMBERT, S.M.; WU, P.P.; WANG, Y.; SPOONDE, A.Y.; KOEHLER, R.T.; PEYRET, N.; CHEN, C.; BROOMER, A.J.; RIDZON, D.A.; ZHOU, H.; HOO, B.S.; HAYASHIBARA, K.C.; LEONG, L.N.; MA, C.N.; ROSENBLUM, B.B.; DAY, J.P.; ZIEGLE, J.S.; DE LA VEGA, F.M.; RHODES, M.D.; HENNESSY, K.M.; WENZ, H.M. The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 16, n. 4, p. 398-406, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361-72, 1992.

MILLER, M.P. RxC: A program for the analysis of contingency tables via the Metropolis Algorithm. **Computer software distributed by author**, 1997.

MANTEL, N.; HAENSZEL, W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 22, n. 4, p. 719-48, 1959.
TING, J.P-Y.; TROWSDALE, J. Genetic control of MHC class II expression. **Cell**, v. 109 Suppl, p. S21-33, 2002

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. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 1, p. 88-94, 2000.

HARTON, J.A; TING, J.P-Y. Class II Transactivator: Mastering the Art of Major Histocompatibility Complex Expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 17, p. 6185-6194, 2000.

SWANBERG, M.; LIDMAN, O.; PADYUKOV, L.; ERIKSSON, P.; AKESSON, E.; JAGODIC, M.; LOBELL, A.; KHADEMI, M.; BÖRJESSON, O.; LINDGREN, C.M.; LUNDMAN, P.; BROOKES, A.J.; KERE, J.; LUTHMAN, H.; ALFREDSSON, L.; HILLERT, J.; KLARESKOG, L.; HAMSTEN, A.; PIEHL, F.; OLSSON, T. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 486-94, 2005.

GHADERI, M.; GAMBELUNGHE, G.; TORTOIOLI, C.; BROZZETTI, A.; JATTA, K.; GHARIZADEH, B.; DE BELLIS, A.; PECORI GIRALDI, F.; TERZOLO, M.; BETTERLE, C.; FALORNI, A. MHC2TA single nucleotide polymorphism and genetic risk for autoimmune adrenal insufficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4107-11, 2006.

SUGIYAMA, H.; MATSUE, H.; NAGASAKA, A.; NAKAMURA, Y.; TSUKAMOTO, K.; SHIBAGAKI, N.; KAWAMURA, T.; KITAMURA, R.; ANDO, N.; SHIMADA, S. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. **Dermatology**, v. 214, n. 3, p. 210-20, 2007.

KUMMER, J.A.; BROEKHUIZEN, R.; EVERETT, H.; AGOSTINI, L.; KUIJK, L.; MARTINON, F.; VAN BRUGGEN, R.; TSCHOPP, J. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** v. 55, n. 5, p. 443-52, 2007.

ROCHA-RODRIGUES, D.B.; PASCHOINI, G.; PEREIRA, S.A.L.; DOS REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A.; RODRIGUES JÚNIOR, V. High levels of interleukin-1 in patients with endemic pemphigus foliaceus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 10, n. 5, p. 741-3. **Am Soc Microbiol**, 2003.

5.7 FIGURES AND TABLES

TABLE 1- SNPS GENOTYPED IN THIS STUDY.

Gene	Chromosome	SNP	Function	Position
<i>CIITA</i>	16p13	rs3087456	promoter	-168A>G
		rs4774	non synonymous	+1632G>C
<i>NLRP1</i>	17p13.2	rs12150220	non synonymous	+1019>A
<i>NLRP3</i>	1q44	rs10754558	3' UTR	+3479G>C
		rs10802501	3' UTR	+3645T>A
<i>NLRP12</i>	19q13.42	rs4419163	5'UTR	+81T>A
		rs34971363	non synonymous	+1426G>C
		rs10410581	3' UTR	+3475C>A

FONT: The author.

TABLE 2 – RESULTS OF THE ASSOCIATION ANALYSES BETWEEN PEMPHIGUS FOLIACEUS AND THE POLYMORPHISMS OF THE *CIITA*, *NLRP1*, *NLRP3*, AND *NLRP12* GENES

Gene	SNP	patients	controls	OR	95% CI	p
<i>CIITA</i>	rs3087456	n=226	n=206			
	allele A	0.47	0.60	0.60	0.46 - 0.79	p<10 ⁻³
	allele G	0.53	0.40	1.66	1.27 - 2.18	
	rs4774	n=246	n=200			
	allele G	0.67	0.71	0.81	0.60 - 1.07	0.15
allele C	0.33	0.29	1.24	0.93 - 1.66		
<i>NLRP1</i>	rs12150220	n=226	n=209			
	allele A	0.68	0.66	1.08	0.81 - 1.43	0.58
	allele T	0.32	0.34	0.93	0.70 - 1.23	
<i>NLRP3</i>	rs10754558	n=252	n=209			
	allele C	0.69	0.63	1.28	0.97 - 1.68	0.08
	allele G	0.31	0.37	0.78	0.60 - 1.03	
	rs10802501	n=249	n=208			
	allele T	0.85	0.87	0.88	0.60 - 1.28	0.50
	allele A	0.15	0.13	1.14	0.78 - 1.66	
<i>NLRP12</i>	rs4419163	n=252	n=209			
	allele A	0.24	0.22	1.09	0.80 - 1.49	0.56
	allele T	0.76	0.78	0.92	0.67 - 1.25	
	rs34971363	n=251	n=208			
	allele C	0.06	0.05	1.35	0.76 - 2.39	0.33
	allele G	0.94	0.95	0.74	0.42 - 1.32	
	rs10410581	n=252	n=209			
allele G	0.92	0.94	0.73	0.43 - 1.23	0.26	
	allele T	0.08	0.06	1.38	0.81 - 2.33	

Allele frequencies (%) of eight SNPs of *CIITA*, *NLRP1*, *NLRP3* and *NLRP12* genes in total sample of patients and controls and results of the association analyses. OR, odds ratio; CI, confidence interval. FONT: The author.

TABLE 3 – FREQUENCIES OF THE ALLELES, ALLELE CARRIERS AND GENOTYPES AND ASSOCIATION ANALYSIS FOR THE *CIITA* RS3087456 SNP IN THE TOTAL SAMPLE AND THE TWO POPULATION STRATA.

	Total					Afro-Brazilians					Euro-Brazilians				
	patients	controls	OR	95% CI	p	patients	controls	OR	95% CI	p	patients	controls	OR	95% CI	p
rs3087456	n=226	n=206				n=97	n=66				n=153	n=140			
allele A	0.47	0.60	0.60	0.46 - 0.79	$p < 10^{-3}$	0.40	0.48	0.74	0.47 - 1.15	0.20	0.51	0.65	0.56	0.40 - 0.78	$p < 10^{-6}$
allele G	0.53	0.40	1.66	1.27 - 2.18		0.60	0.52	1.36	0.87 - 2.12		0.49	0.35	1.79	1.28 - 2.50	
A carriers	0.72	0.82	0.59	0.37 - 0.92	0.014	0.64	0.71	0.72	0.36 - 1.41	0.39	0.76	0.86	0.51	0.28 - 0.94	0.033
G carriers	0.78	0.62	2.15	1.41 - 3.27	$p < 10^{-3}$	0.84	0.76	1.62	0.74 - 3.53	0.25	0.74	0.56	2.25	1.37 - 3.67	0.002
A/A	0.22	0.38	1.00			0.16	0.24	1.00			0.26	0.44	1.00		
G/A	0.50	0.44	1.96	1.25 - 3.07	0.003	0.47	0.47	1.86	0.74 - 4.68	0.39	0.50	0.42	2.02	1.20 - 3.41	0.010
G/G	0.28	0.18	2.59	1.51 - 4.42	$p < 10^{-3}$	0.36	0.29	2.27	0.85 - 6.08	0.25	0.24	0.14	2.94	1.48 - 5.82	0.002
HW	1.00	0.19				1.00	0.63				1.00	0.45			

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HW, Hardy-Weinberg equilibrium p -value.

FONT: The author.

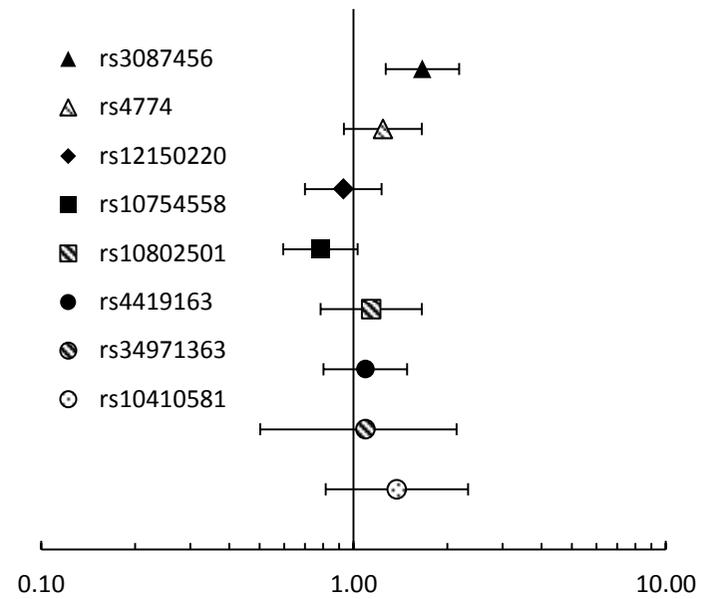


FIGURE 1 - FOREST PLOT OF ODDS RATIO FOR THE MINOR ALLELES OF *CIITA*, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP1* SNPS IN TOTAL SAMPLE. Dots indicates mean values and lines 95% confidence intervals. Triangles for *CIITA*, diamonds for *NLRP1*, squares for *NLRP3* and circles for *NLRP12* SNPs.
 FONT: The author.

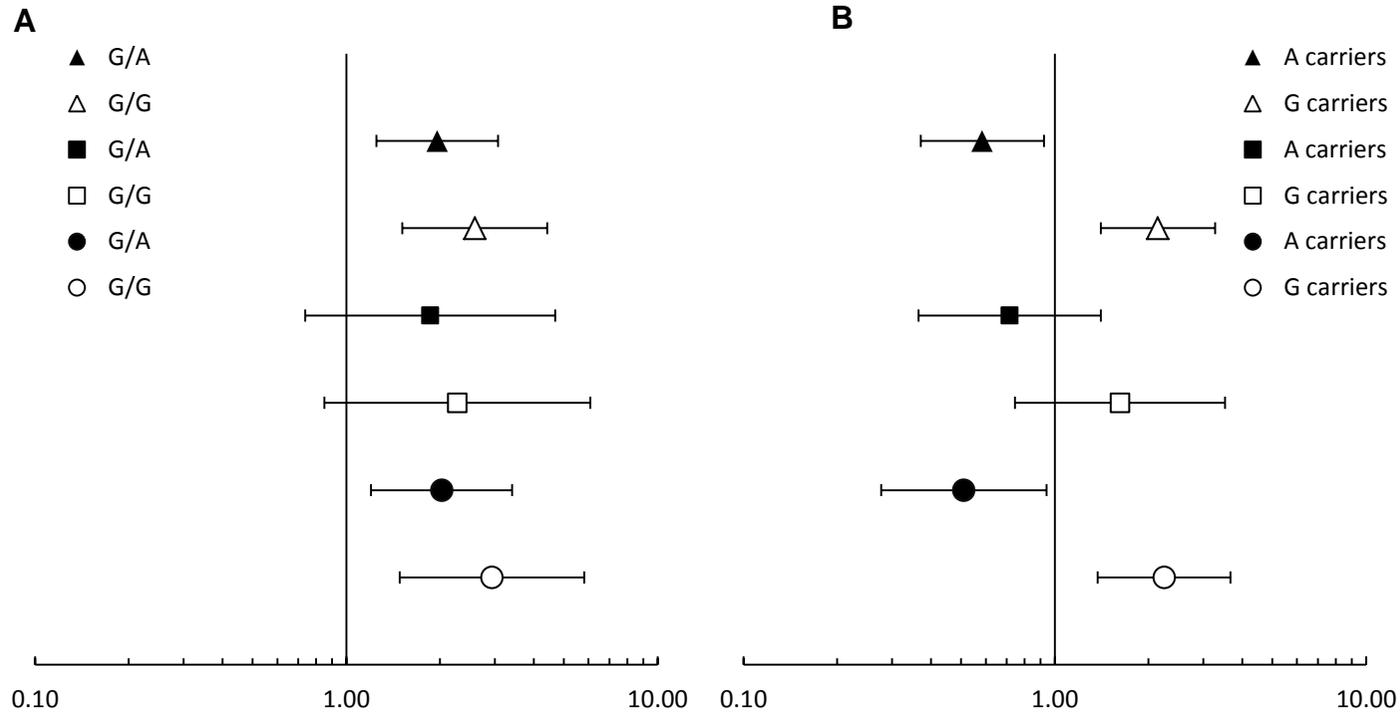


FIGURE 2 – RESULTS OF THE ASSOCIATION ANALYSES FOR THE *CIITA* RS3087456 SNP. Odds ratio (dots) values and 95% confidence intervals (lines) for the genotypes (A) and for the presence of each allele in either homozygosity or heterozygosity (B) are shown. Triangles correspond to total population sample, squares and circles to Afro- and Euro-Brazilians, respectively.

FONT: The author.

		Penfigus foliaceus										Penfigus vulgaris			Controls				
n		6	3	3	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	3	2	2	1	1
Isoforms	S																		
	R3																		
	R4																		
	R5																		
	R6																		

FIGURE 3 – *NLRP12* MRNA EXPRESSION PROFILES IN CD4⁺ T LYMPHOCYTES FROM PATIENTS AND CONTROLS. The individuals are plotted in columns and the isoforms in the lines. Filled boxes indicate the presence of the isoform and open boxes its absence.

FONT: The author.

5.8 SUPPLEMENTARY TABLES

SUPPLEMENTARY TABLE 1 – FREQUENCIES OF THE ALLELES, ALLELE CARRIERS, GENOTYPES AND ASSOCIATION ANALYSIS FOR *CIITA* RS4774 SNP IN THE TOTAL SAMPLE AND THE TWO POPULATION STRATA

	Total					Afro-Brazilians					Euro-Brazilians				
	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>
rs4774	n=246	n=200				n=96	n=62				n=150	n=138			
allele G	0.67	0.71	0.81	0.60 - 1.07	0.15	0.66	0.72	0.77	0.47 - 1.26	0.33	0.67	0.71	0.83	0.58 - 1.18	0.34
allele C	0.33	0.29	1.24	0.93 - 1.66		0.34	0.28	1.30	0.80 - 2.13		0.33	0.29	1.21	0.85 - 1.73	
G carriers	0.90	0.93	0.67	0.34 - 1.32	0.33	0.92	0.92	0.97	0.30 - 3.10	1.00	0.89	0.93	0.55	0.24 - 1.27	0.22
C carriers	0.10	0.50	1.28	0.88 - 1.86	0.22	0.59	0.48	1.56	0.82 - 2.97	0.20	0.54	0.51	1.14	0.72 - 1.81	0.63
G/G	0.44	0.50	1.00			0.41	0.52	1.00			0.46	0.49	1.00		
G/C	0.46	0.43	1.22	0.82 - 1.80	0.36	0.51	0.40	1.61	0.82 - 3.15	0.19	0.43	0.44	1.03	0.64 - 1.68	0.90
C/C	0.10	0.07	1.65	0.81 - 3.36	0.22	0.08	0.08	1.31	0.39 - 4.41	0.77	0.11	0.07	1.86	0.78 - 4.46	0.19
HW	0.45	0.49				0.25	1.00				0.71	0.41			

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HW, Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value.

FONT: The author.

SUPPLEMENTARY TABLE 2 – FREQUENCIES OF THE ALLELES, ALLELE CARRIERS, GENOTYPES AND ASSOCIATION ANALYSIS FOR *NLRP1* RS12150220 SNP IN THE TOTAL SAMPLE AND THE TWO POPULATION STRATA

	Total					Afro-Brazilians					Euro-Brazilians				
	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>
rs12150220	n=226	n=209				n=97	n=66				n=153	n=143			
allele A	0.68	0.66	1.08	0.81 - 1.43	0.58	0.75	0.66	1.53	0.94 - 2.48	0.10	0.64	0.66	0.9	0.64 - 1.26	0.56
allele T	0.32	0.34	0.93	0.70 - 1.23		0.25	0.34	0.54	0.34 - 0.88		0.36	0.34	1.11	0.79 - 1.56	
A carriers	0.89	0.87	1.24	0.70 - 2.21	0.49	0.93	0.85	2.30	0.83 - 6.38	0.13	0.86	0.85	0.91	0.46 - 1.78	0.86
T carriers	0.53	0.54	0.96	0.66 - 1.40	0.78	0.43	0.53	0.68	0.36 - 1.27	0.26	0.58	0.55	1.16	0.73 - 1.84	0.56
A/A	0.47	0.46	1.00			0.57	0.47	1.00			0.42	0.45	1.00		
A/T	0.42	0.41	1.01	0.68 - 1.51	0.92	0.36	0.38	0.79	0.40 - 1.55	0.48	0.44	0.42	1.15	0.71 - 1.88	0.62
T/T	0.11	0.13	0.81	0.44 - 1.48	0.53	0.07	0.15	0.39	0.14 - 1.14	0.11	0.14	0.13	1.18	0.58 - 2.43	0.71
HW	0.647	0.217				0.602	0.269				0.725	0.459			

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HW, Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value.
 FONT: The author.

SUPPLEMENTARY TABLE 3 – FREQUENCIES OF THE ALLELES, ALLELE CARRIERS, GENOTYPES AND ASSOCIATION ANALYSIS FOR *NLRP3* RS10754558 SNP IN THE TOTAL SAMPLE AND THE TWO POPULATION STRATA

	Total						Afro-Brazilians					Euro-Brazilians					
	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>		patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	
rs10754558	n=252	n=209					n=98	n=66				n=154	n=143				
allele C	0.69	0.63	1.28	0.97 - 1.68	0.08		0.72	0.67	1.28	0.80 - 2.07	0.34	0.67	0.62	1.24	0.89 - 1.74	0.21	
allele G	0.31	0.37	0.78	0.60 - 1.03			0.28	0.33	0.78	0.48 - 1.26		0.33	0.38	0.80	0.57 - 1.13		
C carriers	0.90	0.85	1.72	0.98 - 3.02	0.07		0.94	0.89	1.82	0.58 - 5.68	0.39	0.88	0.83	1.60	0.83 - 3.08	0.19	
G carriers	0.53	0.58	0.81	0.56 - 1.18	0.30		0.50	0.56	0.78	0.42 - 1.47	0.53	0.55	0.59	0.84	0.53 - 1.34	0.49	
C/C	0.47	0.42	1.00				0.50	0.44	1.00			0.45	0.41	1.00			
C/G	0.43	0.43	0.91	0.61 - 1.34	0.68		0.44	0.45	0.85	0.44 - 1.63	0.74	0.43	0.41	0.94	0.58 - 1.54	0.90	
G/G	0.10	0.15	0.55	0.31 - 1.01	0.08		0.06	0.11	0.51	0.16 - 1.66	0.36	0.12	0.18	0.61	0.30 - 1.22	0.17	
HW	0.57	0.23					0.46	1.00				0.72	0.15				

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HW, Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value.
 FONT: The author.

SUPPLEMENTARY TABLE 4 – FREQUENCIES OF THE ALLELES, ALLELE CARRIERS, GENOTYPES AND ASSOCIATION ANALYSIS FOR *NLRP3* RS10802501 SNP IN THE TOTAL SAMPLE AND THE TWO POPULATION STRATA

	Total						Afro-Brazilians						Euro-Brazilians					
	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>		patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>		patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	
rs10802501	n=249	n=208					n=97	n=66					n=152	n=142				
allele A	0.15	0.13	1.14	0.78 - 1.66	0.50		0.16	0.12	1.38	0.72 - 2.64	0.42		0.14	0.14	1.03	0.65 - 1.64	0.91	
allele T	0.85	0.87	0.88	0.60 - 1.28			0.84	0.88	0.73	0.38 - 1.39			0.86	0.86	0.97	0.61 - 1.54		
A carriers	0.29	0.25	1.17	0.77 - 1.77	0.51		0.32	0.24	1.47	0.72 - 2.98	0.31		0.26	0.26	1.01	0.60 - 1.71	1.00	
T carriers	0.98	0.99	0.90	0.20 - 4.05	1.00		1.00	1.00	1.47	0.00 - 7.48	1.00		0.97	0.98	0.80	0.18 - 3.63	1.00	
A/A	0.02	0.01	1.00				0.00	0.00					0.03	0.02	1.00			
A/T	0.27	0.24	1.01	0.22 - 4.69	1.00		0.32	0.24	0.52	0.00 - 27.61	1.00		0.23	0.24	0.79	0.17 - 3.81	1.00	
T/T	0.71	0.75	0.86	0.19 - 3.91	1.00		0.68	0.76	0.02	0.02 - 38.93	1.00		0.74	0.76	0.80	0.17 - 3.66	1.00	
HW	0.65	1.00					0.12	0.58					0.52	1.00				

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HW, Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value.
 FONT: The author.

SUPPLEMENTARY TABLE 5 – FREQUENCIES OF THE ALLELES, ALLELE CARRIERS, GENOTYPES AND ASSOCIATION ANALYSIS FOR *NLRP12* RS4419163 SNP IN THE TOTAL SAMPLE AND THE TWO POPULATION STRATA

	Total						Afro-Brazilians					Euro-Brazilians					
	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>		patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	
rs4419163	n=252	n=209					n=98	n=66				n=154	n=143				
allele A	0.24	0.22	1.09	0.80 - 1.487	0.56		0.23	0.21	1.11	0.65 - 1.89	0.79	0.24	0.23	1.09	0.75 - 1.60	0.70	
allele T	0.76	0.78	0.92	0.67 - 1.25			0.77	0.79	0.90	0.53 - 1.54		0.76	0.77	0.91	0.63 - 1.34		
A carriers	0.42	0.40	1.12	0.77 - 1.627	0.59		0.42	0.39	1.11	0.59 - 2.09	0.87	0.43	0.40	1.13	0.71 - 1.80	0.65	
T carriers	0.95	0.95	0.92	0.40 - 2.152	1.00		0.96	0.97	0.73	0.13 - 4.13	1.00	0.94	0.94	0.96	0.36 - 2.55	1.00	
A/A	0.05	0.05	1.00				0.04	0.03	1.00			0.06	0.06	1.00			
A/T	0.37	0.35	0.99	0.41 - 2.39	1.00		0.38	0.36	0.77	0.13 - 4.54	1.00	0.37	0.34	1.03	0.37 - 2.89	1.00	
T/T	0.58	0.60	0.89	0.38 - 2.09	0.83		0.58	0.61	0.71	0.12 - 4.08	1.00	0.57	0.60	0.91	0.34 - 2.47	1.00	
HW	0.54	1.00					0.77	0.71				1.00	0.81				

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HW, Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value.
 FONT: The author.

SUPPLEMENTARY TABLE 6 – FREQUENCIES OF THE ALLELES, ALLELE CARRIERS, GENOTYPES AND ASSOCIATION ANALYSIS FOR *NLRP12* RS34971363 SNP IN THE TOTAL SAMPLE AND THE TWO POPULATION STRATA

	Total						Afro-Brazilians					Euro-Brazilians									
	patients	controls	OR	95% CI		<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI		<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI		<i>p</i>			
rs34971363	n=251	n=208					n=98	n=66					n=153	N=142							
allele C	0.06	0.05	1.35	0.76	-	2.39	0.33	0.06	0.02	3.06	0.85	-	10.94	0.11	0.06	0.07	1.04	0.53	-	2.04	1.00
allele G	0.94	0.95	0.74	0.42	-	1.32		0.94	0.98	0.33	0.09	-	1.17		0.94	0.94	0.96	0.49	-	1.89	
C carriers	0.12	0.09	1.43	0.77	-	2.65	0.29	0.12	0.05	2.93	0.79	-	10.82	0.11	0.12	0.11	1.13	0.55	-	2.34	0.85
G carriers	0.99	0.99	1.21	0.17	-	8.66	1.00	0.99	1.00	0.49	0.02	-	12.18	1.00	0.99	0.99	2.17	0.20	-	24.21	0.61
C/C	0.01	0.01	1.00					0.01	0.00					0.01	0.02	1.00					
C/G	0.11	0.08	1.75	0.22	-	13.65	0.63	0.11	0.05	0.91	0.03	-	27.83	1.00	0.11	0.09	1.53	0.12	-	18.76	0.58
G/G	0.88	0.91	1.16	0.16	-	8.34	1.00	0.88	0.95	2.20	0.09	-	54.95	1.00	0.88	0.90	2.13	0.19	-	23.73	0.62
HW	0.337	0.070						0.347	1.000					0.449	0.074						

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HW, Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value.
 FONT: The author.

SUPPLEMENTARY TABLE 7 – FREQUENCIES OF THE ALLELES, ALLELE CARRIERS, GENOTYPES AND ASSOCIATION ANALYSIS FOR *NLRP12* RS10410581 SNP IN THE TOTAL SAMPLE AND THE TWO POPULATION STRATA

	Total						Afro-Brazilians					Euro-Brazilians				
	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>		patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>	patients	controls	OR	95% CI	<i>p</i>
rs10410581	n=252	n=209					n=98	n=66				n=154	n=143			
allele G	0.92	0.94	0.73	0.43 - 1.23	0.26		0.91	0.94	0.64	0.27 - 1.51	0.40	0.93	0.95	0.81	0.41 - 1.59	0.62
allele T	0.08	0.06	1.38	0.81 - 2.33			0.09	0.06	1.57	0.66 - 3.72		0.07	0.06	1.24	0.63 - 2.42	
G carriers	1.00	1.00	1.21	0.02 - 61.0			1.00	1.00	1.48	0.03 - 75.5	1.00	1.00	1.00	1.08	0.02 - 54.6	1.00
T carriers	0.15	0.11	1.41	0.82 - 2.44	0.22		0.18	0.12	1.63	0.66 - 4.01	0.38	0.14	0.11	1.25	0.63 - 2.51	0.60
G/G	0.85	0.89	1.00				0.82	0.88	1.00			0.86	0.89	1.00		
G/T	0.15	0.11	1.41	0.82 - 2.43	0.22		0.18	0.12	1.25	0.63 - 2.51	0.38	0.14	0.11	1.63	0.66 - 4.01	0.59
T/T	0.00	0.00	1.15	0.02 - 5.82	1.00		0.00	0.00	1.38	0.03 - 70.4	1.00	0.00	0.00	1.05	0.02 - 53.2	1.00
HW	1.00	1.00					1.00	1.00				0.56	1.00			

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HW, Hardy-Weinberg equilibrium *p*-value.
 FONT: The author.

6 DISCUSSÃO

O polimorfismo rs3087456 (comumente chamado de -168 A>G), localizado no gene *CIITA*, apresentou associação significativa com a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. O fator de transcrição *CIITA* é o principal controlador da expressão de genes MHC de classe II, que são cruciais no desenvolvimento do pênfigo. Já foi demonstrado que a interação entre os receptores das células T e peptídeos antigênicos alojados em moléculas MHC de classe II é essencial para a ativação das células B desmogleína-específicas e secreção dos autoanticorpos (NISHIFUJI et al., 2000) e que a variação genotípica de HLA de classe II está fortemente correlacionada com o grau de susceptibilidade ao pênfigo foliáceo (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989; PAVONI et al., 2003).

A associação detectada caracteriza-se pela maior susceptibilidade de indivíduos portadores do alelo G, tanto em homozigose quanto em heterozigose. Entretanto, dominância incompleta é evidenciada pelo risco dos homozigotos: enquanto o risco dos heterozigotos G/A é aproximadamente duas vezes superior àquele dos homozigotos A/A, a dos homozigotos G/G é 2,6 (para a população geral) e 2,9 (eurobrasileiros) vezes superior ao risco dos homozigotos A/A. Apesar de não atingir significância estatística, também é observado um aumento na frequência do alelo G entre pacientes afrobrasileiros quando comparados aos seus respectivos controles. Essa ausência de associação pode ser resultado do tamanho amostral diminuído nesse estrato da população, resultando em menor poder estatístico.

A expressão do gene *CIITA* é regulada de maneira complexa. São conhecidos quatro promotores desse gene e cada um deles é responsável pela expressão de *CIITA* em diferentes tecidos e condições fisiológicas. O SNP rs3087456 localiza-se no promotor III, região cuja função está relacionada principalmente à expressão constitutiva de MHC de classe II em células B (HARTON e TING, 2000). A funcionalidade desse SNP foi caracterizada em um modelo no qual células de sangue periférico foram estimuladas *ex vivo* com IFN- γ (SWANBERG et al., 2005), tendo o genótipo G/G uma menor expressão de *CIITA* e *MHC de classe II* do que os demais genótipos.

O alelo G foi também foi mais frequente em pacientes com artrite reumatoide (SWANBERG et al., 2005) e doença de Addison (GHADERI et al., 2006) do que em controles. Esse resultado é intrigante, uma vez que o alelo G é justamente o alelo relacionado a uma menor expressão de *CIITA* e, conseqüentemente, de MHC de classe II. Nesse cenário, pelo menos duas situações são possíveis: (i) níveis mais elevados de moléculas MHC conferem proteção contra a doença, ou (ii) a baixa expressão de MHC promove a doença. Essas duas possibilidades não são mutuamente excludentes e ambas são capazes de explicar, ao menos em tese, a associação encontrada.

A interação entre os receptores das células T e peptídeos antigênicos alojados em moléculas MHC de classe II é essencial para o desenvolvimento do pênfigo foliáceo. Já foram descritas associações entre alelos de MHC de classe II e a susceptibilidade ao PF (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989; PAVONI et al., 2003), com alguns alelos conferindo proteção a doença (por exemplo, *DRB1*07:01*, OR=0.09, IC 95% 0.03-0.30, $p < 10^{-6}$) (PAVONI et al., 2003). Logo é possível que a expressão em níveis mais elevados desses alelos seja capaz de ajudar a prevenir o estabelecimento da condição patológica. Desse modo, indivíduos portadores do alelo A de *CIITA* e com alelos MHC de classe II de resistência teriam uma chance menor de desenvolver pênfigo foliáceo. Indivíduos A/A teriam maior expressão de MHC de classe II do que indivíduos A/G e conseqüentemente mais proteção, isso resultaria num padrão de dominância incompleta, como o que foi observado, com os heterozigotos apresentando valores de OR intermediário aos dois homozigotos.

Alternativamente, a diminuição da expressão de MHC de classe II pode ser um fator de risco. Entretanto, se a presença dessas moléculas é crítica para o desenvolvimento do PF e se os produtos de certos alelos MHC de classe II estão associados a um risco bastante superior de estabelecimento da doença (por exemplo, *DRB1*01:02*, OR=10.36, IC 95% 5.92-18.13, $p < 10^{-6}$) (PAVONI et al., 2003), como poderia a diminuição de sua expressão conferir maior predisposição ao pênfigo foliáceo? Uma possibilidade é a de que a menor concentração de moléculas MHC de classe II na membrana de células apresentadoras de antígenos resulte numa menor apresentação do autoantígeno desmogleína 1 para células T reguladoras, limitando sua função de indução da tolerância. De fato, a diminuição da função das células T

reguladoras já foi sugerida no desenvolvimento do pênfigo vulgar (VELDMAN et al., 2004). Ainda, níveis mais elevados de RNA mensageiro de *FOXP3* (*forkhead box P3*, um fator de transcrição típico das células T reguladoras) foram observados em lesões de pele de pacientes de pênfigo foliáceo quando comparados com tecido de pele não lesionado do mesmo paciente (Malheiros et al., manuscrito submetido). Foi então proposto que em indivíduos geneticamente susceptíveis as células T reguladoras seriam insuficientes e/ou ineficientes no controle da resposta autoimune, o que resultaria na ativação e expansão de células T patogênicas (MALHEIROS et al., manuscrito submetido). Nesse caso, apesar de reduzida, a quantidade de moléculas MHC de classe II na membrana de células apresentadoras de antígeno ainda seria capaz de estimular as células T autoreativas, mas não seria suficiente para a manutenção da função das células T reguladoras.

Nossos dados não permitem testar essas duas hipóteses, entretanto análises de interação entre o esse polimorfismo de *CIITA* e os alelos de MHC de classe II são pertinentes para a compreensão dessa questão e serão conduzidas em breve.

Embora nós não possamos descartar a possibilidade de que o SNP *CIITA* rs3087456 esteja em desequilíbrio de ligação com outra variante que seja a variante de fato responsável pela associação observada, os estudos de associação já realizados para outras doenças e as prováveis consequências funcionais desse polimorfismo nos levam a propor que ele próprio é o responsável pela associação. Os resultados aqui encontrados ajudam a compreender a patogênese do pênfigo foliáceo e indicam uma possível participação de variação genética de *CIITA* na variação de susceptibilidade a outras doenças autoimunes.

A patogênese do pênfigo foliáceo é conhecida mediada por autoanticorpos contra a desmogleína 1. Esses anticorpos são produzidos por células B específicas mediante ativação por células T autorreativas. As principais doenças influenciadas pelos genes *NLRP* consistem em síndromes autoinflamatórias, cuja patogênese não envolve células T autorreativas ou anticorpos autorreativos (MARTINON et al., 2009). Entretanto existem evidências suficientes para consideramos os genes *NLRP* aqui estudados como bons candidatos a conferirem maior ou menor susceptibilidade ao PF.

A expressão de *NLRP1* e *NLRP3* foi demonstrada em várias células do sistema imune, tais como neutrófilos, células dendríticas e linfócitos B e T. A presença de *NLRP1* já foi demonstrada em células de Langerhans e a de *NLRP3* em queratinócitos (KUMMER et al., 2007). Embora não seja um indicativo direto do envolvimento dessas moléculas, essa distribuição tecidual é compatível com as características patofisiológicas do pênfigo foliáceo. Além disso, a função central desses genes nos inflamassomos levanta a possibilidade de sua participação na doença. Altos níveis de IL-1 β já foram detectados em pacientes de pênfigo foliáceo (ROCHA-RODRIGUES et al., 2003), quando comparados a controles saudáveis, podendo estar envolvidos diretamente no estabelecimento das lesões (BHOL et al., 2001). A associação observada de *NLRP1* com um conjunto de doenças autoimunes e autoinflamatórias associadas ao vitiligo (JIN et al., 2007) também aponta um possível papel na autoimunidade.

Apesar dessas possíveis relações com o pênfigo foliáceo, nós não encontramos nenhuma associação entre polimorfismos desses dois genes e a doença. Isso pode ser resultado de associações genéticas fracas (e que, portanto, demandariam amostras populacionais muito grandes para serem detectadas) ou então da ausência de associação. Nesse caso, o aumento do nível de IL-1 β já descrito em pacientes de PF pode estar relacionado a outros fatores genéticos ou então ser uma consequência da doença já estabelecida. Contudo, não podemos excluir a possibilidade de que outros polimorfismos desses genes que não foram analisados nesse estudo estejam associados ao pênfigo foliáceo.

De maneira semelhante, nenhuma associação foi observada para os SNPs analisados no gene *NLRP12*. Esse gene participa na regulação de NF- κ B (LICH et al., 2007), um fator de transcrição capaz de controlar a expressão de um grande número de genes, em sua maioria envolvidos com respostas imunes. O efeito pleiotrópico de NF- κ B pode ajudar a compreender os resultados encontrados. Devido aos múltiplos efeitos funcionais que esse fator de transcrição exerce, provavelmente a pressão seletiva sobre genes que regulam sua expressão é elevada, não sendo mantidas no estado polimórfico variações com efeitos funcionais, mesmo que sutis.

A expressão das diferentes isoformas de RNAm de *NLRP12* também foi analisada nesse estudo, comparando-se pacientes com PF e indivíduos controle. Nenhuma diferença clara entre os padrões de expressão foi demonstrada. Em células mononucleadas de sangue periférico, o padrão de expressão foi muito semelhante entre todos os indivíduos, ao contrário do que ocorreu para linfócitos T CD4⁺. A grande variação entre indivíduos observada em células T CD4⁺ pode ser resultado da regulação desse gene, considerando que diferentes isoformas podem ser necessárias em momentos ou estados fisiológicos distintos. Alternativamente, essa variação pode ser causada, ao menos em parte, pela presença de subpopulações de células T CD4⁺ que se encontram em diferentes estágios de diferenciação e/ou atividade. Entretanto, não foram observadas diferenças evidentes entre pacientes e controles, o que leva a crer que o estado doença (seja pênfigo foliáceo ou pênfigo vulgar) ou sua ausência não tem influência sobre o padrão de expressão das isoformas de *NLRP12* e vice-versa.

Em outro estudo realizado em nosso grupo de pesquisa foi demonstrado por análises de expressão gênica global em nível de RNA, utilizando-se microarranjos, que pacientes com pênfigo foliáceo apresentam uma maior expressão de *NLRP12* em células T CD4⁺, quando comparados aos controles (MALHEIROS, 2009). Entre as interpretações possíveis, pode a maior expressão estar entre os fatores causais da doença ou entre as consequências, sendo resultado da condição patológica. O padrão aqui encontrado não permite concluir a esse respeito.

Por outro lado, a aparente homogeneidade observada em células mononucleares de sangue periférico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) pode ser explicada pela heterogeneidade dessas células. As PBMCs compreendem um conjunto muito diverso de células, assim, qualquer subpopulação que expresse uma ou mais isoformas de *NLRP12* se somará a outras subpopulações que expressam esse gene de forma diferenciada, o mesmo acontecendo para as subpopulações que não o expressam. Embora possam existir diferenças substanciais entre essas subpopulações e entre indivíduos, esse padrão diferencial de expressão poderia ser apagado quando essas subpopulações são somadas. O resultado disso são os perfis de

expressão de *NLRP12* observados em PBMCs, em que todos os transcritos são observados em todos os indivíduos.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos dados gerados nesse estudo e das informações disponíveis na literatura, podemos concluir que:

- I. O SNP rs3087456, localizado na região promotora do gene *CIITA*, está associado ao pênfigo foliáceo.
- II. Não é observada associação entre os SNPs rs4774 (*CIITA*), rs12150220 (*NLRP1*), rs10754558, rs10802501 (*NLRP3*), rs4419163, rs34971363 e rs10410581 (*NLRP12*) e a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo.
- III. A expressão de diferentes isoformas do gene *NLRP12* é bastante variável entre indivíduos, sejam eles pacientes de pênfigo (foliáceo ou vulgar), ou indivíduos livres dessas doenças.
- IV. Não há diferenças claras entre pacientes e controles quanto à expressão de diferentes isoformas do gene *NLRP12*, tanto em células mononucleares de sangue periférico quanto em linfócito T CD4⁺.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-SATER, A.A.; SAÏD-SADIER, N.; LAM, V.M.; SINGH, B.; PETTENGILL, M.A.; SOARES, F.; TATTOLI, I.; LIPINSKI, S.; GIRARDIN, S.E.; ROSENSTIEL, P.; OJCIUS D.M. et al. Enhancement of reactive oxygen species production and chlamydial infection by the mitochondrial Nod-like family member NLRX1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 53, p. 41637-45, 2010.

ABRÈU-VELEZ, A.M.; HASHIMOTO, T.; BOLLAG, W.B.; TOBÓN ARROYAVE, S.; ABRÈU-VELEZ, C.E.; LONDOÑO, M.L.; MONTOYA, F.; BEUTNER, E.H. A unique form of endemic pemphigus in northern Colombia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 4, p. 599-608, 2003.

AMAGAI, M.; HASHIMOTO, T.; GREEN, K.J.; SHIMIZU, N.; NISHIKAWA, T. Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 6, p. 895-901, 1995.

AMAGAI, M.; NISHIKAWA, T.; NOUSARI, H.C.; ANHALT, G.J.; HASHIMOTO, T. Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 4, p. 775-82, 1998.

AMAGAI, M. The molecular logic of pemphigus and impetigo: the desmoglein story. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 308-12, 2009.

AMAGAI, M. Autoimmune and infectious skin diseases that target desmogleins. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 86, n. 5, p. 524-537, 2010.

ANHALT, G.J.; LABIB, R.S.; VOORHEES, J.J.; BEALS, T.F.; DIAZ, L.A. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 306, n. 20, p. 1189-96, 1982.

ANHALT, G.J.; KIM, S.C.; STANLEY, J.R.; KORMAN, N. J.; JABS, D. A.; KORY, M.; IZUMI, H.; RATRIE, H.; MUTASIM, D.; ARISS-ABDO, L. Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 25, p. 1729-35, 1990.

AOKI, V.; MILLIKAN, R.C.; RIVITTI, E.A.; HANS-FILHO, G.; EATON, D.P.; WARREN, S.J.P.; LI, N.; HILARIO-VARGAS, J.; HOFFMANN, R.G.; DIAZ, L.A. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 34-40, 2004.

ARNOULT, D.; SOARES F.; TATTOLI, I.; CASTANIER, C.; PHILPOTT, D.J.; GIRARDIN; S.E. An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 17, p. 3161-8, 2009.

ARREDONDO, J.; CHERNYAVSKY, A. I.; KARAOUNI, A.; GRANDO, S. A. Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 6, p. 1531-44, 2005.

AUSUBEL, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature Immunology**, v. 6, n. 10, p. 973-9, 2005.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; PAOLETTI, I.; ORLANDO, M.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V. Pemphigus serum and captopril induce heat shock protein 70 and inducible nitric oxide synthase overexpression, triggering apoptosis in human keratinocytes. **The British journal of Dermatology**, v. 150, n. 6, p. 1070-80, 2004.

BASTUJI-GARIN, S.; SOUISSI, R.; BLUM, L.; TURKI, H.; NOUIRA, R.; JOMAA, B.; ZAHAF, A.; BEN OSMAN, A.; MOKHTAR, I.; FAZAA, B. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 2, p. 302-5, 1995.

BASTUJI-GARIN, S.; TURKI, H.; MOKHTAR, I.; NOUIRA, R.; FAZAA, B.; JOMAA, B.; ZAHAF, A.; OSMAN, A.B.; SOUISSI, R.; HÉMON, D.; ROUJEAU, J-C.; KAMOUN, M.R. Possible relation of Tunisian pemphigus with traditional cosmetics: a multicenter case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v. 155, n. 3, p. 249-56, 2002.

BERKOWITZ, P.; DIAZ, L. A.; HALL, R.P.; RUBENSTEIN, D.S. Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 3, p. 738-40, 2008.

BRAUN-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M.L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 547-58, 2007.

CHAMAILLARD, M.; PHILPOTT, D.; GIRARDIN, S.E.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; CHAREYRE, F.; BUI, T.H.; GIOVANNINI, M.; ZAEHRINGER, U.; PENARD-LACRONIQUE, V.; SANSONETTI, P.J.; HUGOT, J-P. THOMAS, G. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 6, p. 3455-60, 2003.

CRUZ, C.M.; RINNA, A.; FORMAN, H.J.; VENTURA, A.L.M.; PERSECHINI, P.M.; OJCIUS, D.M. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2871-9, 2007.

CULTON, D.A.; QIAN, Y.; LI, N.; RUBENSTEIN, D.; AOKI, V.; FILHIO, G.H.; RIVITTI, E.A.; DIAZ, L.A. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 31, n. 4, p. 311-24, 2008.

DALLA-COSTA, R.; PINCERATI, M.R.; BELTRAME, M.H.; MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M.L. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 71, n. 8, p. 809-17, 2010.

DANGL, J.L.; JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826-33, 2001.

DIAZ, L.A.; MARCELO, C.L. Pemphigoid and pemphigus antigens in cultured epidermal cells. **The British Journal of Dermatology**, v. 98, n. 6, p. 631-7, 1978.

DIAZ, L.A.; SAMPAIO, S.A.; RIVITTI, E.A.; MARTINS, C.R.; CUNHA, P.R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F.A.; CASTRO, R.M.; MACCA, M.L.; LAVRADO, C. Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, n. 1, p. 4-12, 1989.

DODÉ, C.; LE DÛ, N.; CUISSET, L.; LETOURNEUR, F.; BERTHELOT, J.-M.; VAUDOUR, G.; MEYRIER, A.; WATTS, R.A.; SCOTT, D.G.I.; NICHOLLS, A.; GRANEL, B.; FRANCES, C.; GARCIER, F.; EDERY, P.; BOULINGUEZ, S.; DOMERGUES, J-P.; DELPECH, M.; GRATEAU, G. New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a

novel mutation underlies both syndromes. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 6, p. 1498-506, 2002.

ESPAÑA, A.; DIAZ, L.A.; MASCARÓ, J.M.; GIUDICE, G.J.; FAIRLEY, J.A.; TILL, G.O.; LIU, Z. Mechanisms of acantholysis in pemphigus foliaceus. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 85, n. 1, p. 83-9, 1997.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; ROCHA-ALVAREZ, R.; FERRARI, I.; COIMBRA, C. E.; MORAES, J.R.; FLOWERS, N.M.; STASTNY, P.; FERNANDEZ-VIÑA, M.; OLAGUE-ALCALA, M. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in native Americans from Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 949-56, 1995.

FRITZ, J.H.; FERRERO, R.L.; PHILPOTT, D.J.; GIRARDIN, S.E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nature Immunology**, v. 7, n. 12, p. 1250-7, 2006.

GHADERI, M.; GAMBELUNGHE, G.; TORTOIOLI, C.; BROZZETTI, A.; JATTA, K.; GHARIZADEH, B.; DE BELLIS, A.; PECORI GIRALDI, F.; TERZOLO, M.; BETTERLE, C.; FALORNI, A. MHC2TA single nucleotide polymorphism and genetic risk for autoimmune adrenal insufficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4107-11, 2006.

GIRARDIN, S.E.; BONECA, I.G.; VIALA, J.; CHAMAILLARD, M.; LABIGNE, A.; THOMAS, G.; PHILPOTT, D.J.; SANSONETTI, P.J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 8869-72, 2003.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361-72, 1992.

HALLE, A.; HORNING, V.; PETZOLD, G.C.; STEWART, C.R.; MONKS, B.G.; REINHECKEL, T.; FITZGERALD, K.A.; LATZ, E.; MOORE, K.J.; GOLENBOCK, D.T. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 857-65, 2008.

HAMPE, J.; CUTHBERT, A.; CROUCHER, P.J.; MIRZA, M.M.; MASCHERETTI, S.; FISHER, S.; FRENZEL, H.; KING, K.; HASSELMEYER, A.; MACPHERSON, A.J.; BRIDGER, S.; VAN DEVENTER, S.; FORBES, A.; NIKOLAUS, S.; LENNARD-JONES, J.E.; FOELSCH, U.R.; KRAWCZAK, M.; LEWIS, C.; SCHREIBER, S.; MATHEW, C.G. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. **Lancet**, v. 357, n. 9272, p. 1925-8, 2001.

HAMPE, J.; GREBE, J.; NIKOLAUS, S.; SOLBERG, C.; CROUCHER, P.J.P.; MASCHERETTI, S.; JAHNSEN, J.; MOUM, B.; KLUMP, B.; KRAWCZAK, M.; MIRZA, M.M.; FOELSCH, U.R.; VATN, M.; SCHREIBER, S. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. **Lancet**, v. 359, n. 9318, p. 1661-5, 2002.

HANS-FILHO, G. Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem)—1998. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 225-235, 1999.

HARTON, J.A.; TING, J.P-Y. Class II Transactivator: Mastering the Art of Major Histocompatibility Complex Expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 17, p. 6185-6194, 2000.

HARTON, J.A.; LINHOFF, M.W.; ZHANG, J.; TING, J.P-Y. CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 8, p. 4088-93, 2002.

HASHIMOTO, K.; SHAFRAN, K.M.; WEBBER, P.S.; LAZARUS, G.S.; SINGER, K.H. Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 157, n. 1, p. 259-72, 1983.

HEDRICK, P.W. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. **Genetics**, v. 117, n. 2, p. 331-41, 1987.

HERTL, M.; EMING, R.; VELDMAN, C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1159-66, 2006.

HIETANEN, J.; SALO, O.P. Pemphigus: an epidemiological study of patients treated in Finnish hospitals between 1969 and 1978. **Acta Dermatovenereologica**, v. 62, n. 6, p. 491-6, 1982.

HOFFMAN, H.M.; MUELLER, J.L.; BROIDE, D.H.; WANDERER, A.A.; KOLODNER, R.D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nature Genetics**, v. 29, n. 3, p. 301-5, 2001.

HOFMANN, K. The modular nature of apoptotic signaling proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 8-9, p. 1113-28, 1999.

HORNUNG, V.; BAUERNFEIND, F.; HALLE, A.; SAMSTAD, E.O.; KONO, H.; ROCK, K.L.; FITZGERALD, K.A.; LATZ, E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 847-56, 2008.

INOHARA, N.; NUÑEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 5, p. 371-82, 2003.
INOHARA, N. OGURA, YASUNORI; NUÑEZ, G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 76-80, 2002.

INOHARA, N.; CHAMAILLARD, M.; MCDONALD, C.; NUÑEZ, G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 355-83, 2005.

ISHII, K.; AMAGAI, M.; HALL, R.P.; HASHIMOTO, T.; TAKAYANAGI, A.; GAMOU, S.; SHIMIZU, N.; NISHIKAWA, T. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 4, p. 2010-7, 1997.

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 2, p. 197-216, 2002.

JIN, Y.; MAILLOUX, C.M.; GOWAN, K.; RICCARDI, S.L.; LABERGE, G.; BENNETT, D.C.; FAIN, P.R.; SPRITZ, R.A. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 356 n. 12 p. 1216-25, 2007.

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-9, 2006.

JORDON, R.E. Complement activation in pemphigus. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 357-8., 1980.

JÉRU, I.; DUQUESNOY, P.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; COCHET, E.; YU, J.W.; LACKMY-PORT-LIS, M.; GRIMPREL, E.; LANDMAN-PARKER, J.; HENTGEN, V.; MARLIN, S.; MCELREAVEY, K.; SARKISIAN, T.; GRATEAU, G.; ALNEMRI, E.S.; AMSELEM, S. Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 5, p. 1614-9, 2008.

KANNEGANTI, T-D.; BODY-MALAPEL, M.; AMER, A.; PARK, J-H.; WHITFIELD, J.; FRANCHI, L.; TARAPOREWALA, Z.F.; MILLER, D.; PATTON, J.T.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p. 36560-8, 2006.

KANNEGANTI, T-D.; LAMKANFI, M.; KIM, Y-G.; CHEN, G.; PARK, J-H.; FRANCHI, L.; VANDENABEELE, P.; NÚÑEZ, G. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 433-43, 2007.

KIM, S.C.; KWON, Y.D.; LEE, I.J.; CHANG, S.N.; LEE, T.G. cDNA cloning of the 210-kDa paraneoplastic pemphigus antigen reveals that envoplakin is a component of the antigen complex. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 3, p. 365-9, 1997.

KIYOKAWA, C.; RUHRBERG, C.; NIE, Z.; KARASHIMA, T.; MORI, O.; NISHIKAWA, T.; GREEN, K.J.; ANHALT, G.J.; DICOLANDREA, T.; WATT, F.M.; HASHIMOTO, T. Envoplakin and periplakin are components of the paraneoplastic pemphigus antigen complex. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 6, p. 1236-8, 1998.

KUMMER, J.A.; BROEKHUIZEN, R.; EVERETT, H.; AGOSTINI, L.; KUIJK, L.; MARTINON, F.; VAN BRUGGEN, R.; TSCHOPP, J. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** v. 55, n. 5, p. 443-52, 2007.

KÖHLER, K.F.; PETZL-ERLER, M.L. No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, n. 2, p. 141-4, 2006.

LANGE, C.; HEMMRICH, G.; KLOSTERMEIER, U.C.; LÓPEZ-QUINTERO, J.A.; MILLER, D.J.; RAHN, T.; WEISS, Y.; BOSCH, T.C.G.; ROSENSTIEL, P. Defining the origins of the NOD-like receptor system at the base of animal evolution. **Molecular Biology and Evolution**.; v.28 n.5 p.1687-702, 2010.

LI, N.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E.A; DIAZ, L.A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 11, p. 1501-10, 2003.

LICH, J. D.; TING, J. P-Y. CATERPILLER (NLR) family members as positive and negative regulators of inflammatory responses. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 4, n. 3, p. 263-6, 2007.

LICH, J.D.; WILLIAMS, K.L.; MOORE, C.B.; ARTHUR, J.C.; DAVIS, B.K.; TAXMAN, D.J.; TING, J.P-Y. Monarch-1 suppresses non-canonical NF-kappaB activation and p52-dependent chemokine expression in monocytes. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 3, p. 1256-60, 2007.

MAGALHAES, J.G.; SORBARA, M.T.; GIRARDIN, S.E.; PHILPOTT, D.J. What is new with Nods? **Current Opinion in Immunology**, v.23 p.1-6, 2010.

MAHONEY, M.G.; WANG, Z.H.; STANLEY, J.R. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 1, p. 22-5, 1999.

MAHONEY, M.G.; WANG, Z.; ROTHENBERGER, K.; KOCH, P.J.; AMAGAI, M.; STANLEY, J.R. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 4, p. 461-8, 1999.

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M.L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 6, p. 547-58, 2009.

MALHEIROS, D. Análise do Perfil de Expressão Gênica de Linfócitos T CD4+ Aplicada ao Estudo da Doença Autoimune Pênfigo Foliáceo Endêmico. Tese de Doutorado, **Universidade Federal do Paraná**, 2009.

MANTEL, N.; HAENSZEL, W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 22, n. 4, p. 719-48, 1959.

MARTEL, P.; JOLY, P. Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. **Clinics in Dermatology**, v. 19, n. 6, p. 662-74, 2001.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, 2002.

MARTINON, F.; AGOSTINI, L.; MEYLAN, E.; TSCHOPP, J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. **Current Biology**, v. 14, n. 21, p. 1929-34, 2004.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 8, p. 447-54, 2005.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 1, p. 10-22, 2007.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 229-65, 2009.

MCCALL, S.H.; SAHRAEI, M.; YOUNG, A.B.; WORLEY, C.S.; DUNCAN, J.A.; TING, J.P.-Y.; MARRIOTT, I. Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 1, p. 30-40, 2008.

MEISSNER, T.B.; LI, A.; BISWAS, A.; LEE, K.-H.; LIU, Y.-J.; BAYIR, E.; ILIOPOULOS, D.; VAN DEN ELSEN, P.J.; KOBAYASHI, K.S. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 31, p. 13794-9, 2010.

MESSIAS, I.T.; SANTAMARIA, J.; RAGIOTTO, R.; DOI, E. M.; KAJDACSY-BALLA, A. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 51-5, 1989.

MEYER, N.; MISERY, L. Geoepidemiologic considerations of auto-immune pemphigus. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. 379-82, 2010.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39-44, 2006.

MICELI-RICHARD, C.; LESAGE, S.; RYBOJAD, M.; PRIEUR, A.M.; MANOUVRIER-HANU, S.; HÄFNER, R.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; THOMAS, G.; HUGOT, J.P. CARD15 mutations in Blau syndrome. **Nature Genetics**, v. 29, n. 1, p. 19-20, 2001.

MILLER, M.P. RxC: A program for the analysis of contingency tables via the Metropolis Algorithm. **Computer software distributed by author**, 1997.

MOORE, C.B.; BERGSTRALH, D.T.; DUNCAN, J.A.; LEI, Y.; MORRISON, T.E.; ZIMMERMANN, A.G.; ACCAVITTI-LOPER, M.A.; MADDEN, V.J.; SUN, L.; YE, Z.; LICH, J.D.; HEISE, M.T.; CHEN, Z.; TING, J.P-Y. NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. **Nature**, v. 451, n. 7178, p. 573-7, 2008.

MORINI, J.P.; JOMAA, B.; GORGI, Y.; SAGUEM, M.H.; NOUIRA, R. ROUJEAU, J.C.; REVUZ, J. Pemphigus foliaceus in young women. An endemic focus in the Sousse area of Tunisia. **Archives of Dermatology**, v. 129, n. 1, p. 69-73, 1993.

MUTASIM, D.F.; DIAZ, L.A. The relevance of immunohistochemical techniques in the differentiation of subepidermal bullous diseases. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 13, n. 1, p. 77-83., 1991.

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. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 1, p. 88-94, 2000.

OGURA, Y. Genetic variation and activity of mouse Nod2, a susceptibility gene for Crohn's disease. **Genomics**, v. 81, n. 4, p. 369-377, 2003.

OURSLEER, J.R.; LABIB, R.S.; ARISS-ABDO, L.; BURKE, T.; O'KEEFE, E.J.; ANHALT, G.J. Human autoantibodies against desmoplakins in paraneoplastic pemphigus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 6, p. 1775-82, 1992.

PAVONI, D.P.; ROXO, V.M.M.S; MARQUART FILHO, A.; PETZL-ERLER, M.L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 2, p. 110-6, 2003.

PEREIRA, N.F.; HANSEN, J.A.; LIN, M-T.; ROXO, V.M.M.S.; BRAUN, K.; PETZL-ERLER, M.L. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, n. 6, p. 233-41, 2004.

PETZL-ERLER, M.L.; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, v. 33, n. 3, p. 408-14, 1989.

PETZL-ERLER, M.L.; MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? **Journal of Autoimmunity**, v. 25, n. 2, p. 121-5, 2005.

PONTILLO, A.; BRANDAO, L.; GUIMARAES, R.; SEGAT, L.; ARAUJO, J.; CROVELLA, S. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. **Autoimmunity**, v. 43, n. 8, p. 583-9, 2010.

PONTILLO, A.; VENDRAMIN, A.; CATAMO, E.; FABRIS, A.; CROVELLA, S. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 3, p. 539-44, 2011.

PUVIANI, M.; MARCONI, A.; COZZANI, E.; PINCELLI, C. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 1, p. 164-7, 2003.

REITH, W.; MACH, B. The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 331-73, 2001.
ROBLEDO, M.A.; STEMA PRADA, C.; JARAMILLO, D.; LEON, W. South American pemphigus foliaceus: Study of an epidemic in El Bagre and Nechi, Colombia 1982 to 1986. **British Journal of Dermatology**, v. 118, n. 6, p. 737-744, 1988.

ROCHA-RODRIGUES, D.B.; PASCHOINI, G.; PEREIRA, S.A.L.; DOS REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A.; RODRIGUES JÚNIOR, V. High levels of interleukin-1 in patients with endemic pemphigus foliaceus. Clinical and diagnostic laboratory immunology, v. 10, n. 5, p. 741-3. **Am Soc Microbiol**, 2003.

ROSCOE, J.T.; DIAZ, L.; SAMPAIO, S.A.; CASTRO, R.M.; LABIB, R.S.; TAKAHASHI, Y.; PATEL, H.; ANHALT, G.J. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, n. 6, p. 538-41, 1985.

ROXO, V.M.M.S.; PEREIRA, N.F.; PAVONI, D.P.; LIN, M-T.; HANSEN, J.A.; POERSCH, C.O.; FILHO, A.M.; PETZL-ERLER, M.L. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus - are there any associations? **Tissue Antigens**, v. 62, n. 5, p. 394-400, 2003.

SAMS, W.M.; JORDON, R.E. Correlation of pemphigoid and pemphigus antibody titres with activity of disease. **The British Journal of Dermatology**, v. 84, n. 1, p. 7-13, 1971.

SANTOS, S.N.M.B.; FILGUEIRA, A.L.; PATRUS, O.A.; DIAZ, L.A. Perfil Evolutivo das Subclasses de Imunoglobulinas Gama em Pacientes de Pênfigo Foliáceo Endêmico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 76, n. 5, p. 561-574, 2001.

SCHILTZ, J. R.; MICHEL, B. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, n. 2, p. 254-60, 1976.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-32, 2010.

SHAMI, P.J.; KANAI, N.; WANG, L.Y.; VREEKE, T.M.; PARKER, C.H. Identification and characterization of a novel gene that is upregulated in leukaemia cells by nitric oxide. **British Journal of Haematology**, v. 112, n. 1, p. 138-47, 2001.

SHAW, P. J.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T.-D. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 3, p. 624-7, 2010.

SPIERS, E.M.; LAZARUS, G.S.; LYONS-GIORDANO, B. Expression of plasminogen activator enzymes in psoriatic epidermis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 3, p. 333-8, 1994.

STEIMLE, V.; OTTEN, L.A.; ZUFFEREY, M.; MACH, B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). **Cell**, v. 75, n. 1, p. 135-46, 1993.

SUGIYAMA, H.; MATSUE, H.; NAGASAKA, A.; NAKAMURA, Y.; TSUKAMOTO, K.; SHIBAGAKI, N.; KAWAMURA, T.; KITAMURA, R.; ANDO, N.; SHIMADA, S. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are markedly decreased in blood of patients with pemphigus vulgaris. **Dermatology**, v. 214, n. 3, p. 210-20, 2007.

SWANBERG, M.; LIDMAN, O.; PADYUKOV, L.; ERIKSSON, P.; AKESSON, E.; JAGODIC, M.; LOBELL, A.; KHADEMI, M.; BÖRJESSON, O.; LINDGREN, C.M.; LUNDMAN, P.; BROOKES, A.J.; KERE, J.; LUTHMAN, H.; ALFREDSSON, L.; HILLERT, J.; KLARESKOG, L.; HAMSTEN, A.; PIEHL, F.; OLSSON, T. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 486-94, 2005.

TATTOLI, I.; CARNEIRO, L.A.; JÉHANNO, M.; MAGALHAES, J.G.; SHU, Y.; PHILPOTT, D.J.; ARNOULT, D.; GIRARDIN, S.E. NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. **EMBO Reports**, v. 9, n. 3, p. 293-300, 2008.

THOMAS, M.; PAUL, C.; BERARD, E.; FORTENFANT, F.; MAZEREEUW-HAUTIER, J.; LIVIDEANU, C.; VIRABEN, R.; MEYER, N. Incidence of auto-immune pemphigus in the Midi-Pyrénées region in 2002-2006. **Dermatology**, v. 220, n. 2, p. 97-102, 2010.

TING, J.P.-Y.; DAVIS, B.K. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 387-414, 2005.

TING, J.P.-Y.; LOVERING, R.C.; ALNEMRI, E.S.; BERTIN, J. BOSS, J.M.; DAVIS, B.K.; FLAVELL, R.A.; GIRARDIN, S.E.; GODZIK, A.; HARTON, J.A.; HOFFMAN, H.M.; HUGOT, J-P.; INOHARA, N.; MACKENZIE, A.; MALTAIS, L.J.; NUNEZ, G.; OGURA, Y.; OTTEN, L.A.; PHILPOTT, D.; REED, J.C.; REITH, W.; SCHREIBER, S.; STEIMLE, V.; WARD, P.A. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, v. 28, n. 3, p. 285-7, 2008.

TING, J.P.-Y.; TROWSDALE, J. Genetic control of MHC class II expression. **Cell**, v. 109 Suppl, p. S21-33, 2002.

TOBLER, A.R.; SHORT, S.; ANDERSEN, M.R.; PANER, T.M.; BRIGGS, J.C.; LAMBERT, S.M.; WU, P.P.; WANG, Y.; SPOONDE, A.Y.; KOEHLER, R.T.; PEYRET, N.; CHEN, C.; BROOMER, A.J.; RIDZON, D.A.; ZHOU, H.; HOO, B.S.; HAYASHIBARA, K.C.; LEONG, L.N.; MA, C.N.; ROSENBLUM, B.B.; DAY, J.P.; ZIEGLE, J.S.; DE LA VEGA, F.M.; RHODES, M.D.; HENNESSY, K.M.; WENZ, H.M. The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 16, n. 4, p. 398-406, 2005.

TRON, F.; GILBERT, D.; MOUQUET, H.; JOLY, P.; DROUOT, L.; MAKNI, S.; MASMOUDI, H.; CHARRON, D.; ZITOUNI, M.; LOISEAU, P.; BEN AYED, M. Genetic factors in pemphigus. **Journal of Autoimmunity**, v. 24, n. 4, p. 319-28, 2005.

TRÉMEAU-MARTINAGE, C.; OKSMAN, F.; BAZEX, J. Immunoglobulin G subclass distribution of anti-intercellular substance antibodies in pemphigus. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 122, n. 6-7, p. 409-11, 1995.

TSCHOPP, J.; MARTINON, F.; BURNS, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 95-104, 2003.

TSUNODA, K.; OTA, T.; SUZUKI, H.; OHYAMA, M.; NAGAI, T.; NISHIKAWA, T.; AMAGAI, M.; KOYASU, S. Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 3, p. 627-33, 2002.

UDEY, M. C.; STANLEY, J. R. Pemphigus--diseases of antidesmosomal autoimmunity. **Journal of the American Medical Association**, v. 282, n. 6, p. 572-6, 1999.

VELDMAN, C.; HÖHNE, A.; DIECKMANN, D.; SCHULER, G.; HERTL, M. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 6468-75, 2004.

VELDMAN, C.; PAHL, A.; BEISSERT, S.; HANSEN, W.; BUER, J.; DIECKMANN, D.; SCHULER, G.; HERTL, M. Inhibition of the transcription factor Foxp3 converts desmoglein 3-specific type 1 regulatory T cells into Th2-like cells. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3215-22, 2006.

WANG, L.; MANJI, G.A.; GRENIER, J.M.; AL-GARAWI, A.; MERRIAM, S.; LORA, J.M.; GEDDES, B.J.; BRISKIN, M.; DISTEFANO, P.S.; BERTIN, J. PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29874-80, 2002.

WARREN, S.J.; LIN, M.S.; GIUDICE, G.J.; HOFFMANN, R.G.; HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E.A.; SANTOS, V.; DIAZ, L.A. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 23-30, 2000.

WILLIAMS, K.L.; TAXMAN, D.J.; LINHOFF, M.W.; REED, W.; TING, J.P.-Y. Monarch-1: a pyrin/nucleotide-binding domain/leucine-rich repeat protein that controls classical and nonclassical MHC class I genes. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 11, p. 5354-8, 2003.

WU, H. WANG, Z.H.; YAN, A.; LYLE, S.; FAKHARZADEH, S.; WAHL, J.K.; WHEELOCK, M.J.; ISHIKAWA, H.; UITTO, J.; AMAGAI, M.; STANLEY, J.R. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 31-5, 2000.

XUE, W.; HASHIMOTO, K.; TOI, Y. Functional involvement of urokinase-type plasminogen activator receptor in pemphigus acantholysis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 25, n. 9, p. 469-74, 1998.

YE, Z.; LICH, J.D.; MOORE, C.B.; DUNCAN, J.A.; WILLIAMS, K.L.; TING, J.P.-Y. ATP binding by monarch-1/NLRP12 is critical for its inhibitory function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 5, p. 1841-50, 2008.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; ALVES, G.F. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 11, p. 812-4, 2000.

ZHANG, P.; DIXON, M.; ZUCHELLI, M.; HAMBILIKI, F.; LEVKOV, L.; HOVATTA, O.; KERE, J. Expression analysis of the NLRP gene family suggests a role in human preimplantation development. **PloS One**, v. 3, n. 7, p. e2755, 2008.

ZURAWEK, M.; FICHNA, M.; JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA, D.; GRYCZYŃSKA, M.; FICHNA, P.; NOWAK, J. A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease. **Human Immunology**, v. 71, n. 5, p. 530-4, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - MÉTODOS SUPLEMENTARES

Caracterização das amostras

A amostra analisada neste estudo consiste em dois grupos, sendo um de 251 pacientes de pênfigo foliáceo e outro de 209 controles sem histórico da doença. Os pacientes foram diagnosticados com base em dados clínicos e imunohistoquímicos. Tanto pacientes quanto controles foram submetidos a uma entrevista padronizada na qual foram obtidos dados socioeconômicos, familiares, étnicos e de saúde. Após entrevista foi realizada a coleta do material biológico. As coletas tiveram início no ano de 1984 e seguiram de forma contínua até o presente. Apesar da continuidade, o fluxo de pacientes não foi constante, com períodos de coleta mais, ou menos, intensa. Inicialmente os pacientes foram contatados no hospital de dermatologia sanitária no município de Piraquara, Paraná (n=21). A partir da década de 90 os pacientes passaram a ser contatados no Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande, Mato Grosso do Sul) e nas suas imediações onde, devido à facilidade de acesso ao tratamento, reside um número considerável de pacientes de pênfigo foliáceo. É dessa região que provém a maior parte dos casos aqui estudados (n=210). Mais recentemente também foram realizadas coletas no ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, (n=21). A amostra controle é constituída por familiares não consanguíneos ou outras pessoas próximas, mas não aparentadas, aos pacientes. Supostamente esses indivíduos apresentam chances de exposição a fatores ambientais semelhantes à dos pacientes.

Para as análise do RNA mensageiro do gene *NLRP12* a amostra consiste em 21 pacientes de pênfigo foliáceo, 6 pacientes de pênfigo vulgar e 59 indivíduos controle. Esses pacientes também foram diagnosticados com base em dados clínicos e imunohistoquímicos e foram contatados no ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A amostra controle

também inclui 9 indivíduos de Ribeirão Preto além de 50 voluntários contatados em Curitiba.

Devido a possíveis diferenças nas frequências alélicas e uma possível estruturação populacional, pacientes e controles foram classificados e pareados quanto a sua ancestralidade. Essa classificação se deu com base em critérios fenotípicos separando a amostra em dois grupos: eurobrasileiros, de ancestralidade predominantemente europeia e afrobrasileiros, de ancestralidade mista, predominantemente africana e europeia. Apesar de não diferir estatisticamente, dentre os pacientes é observada uma proporção ligeiramente mais elevada de afrobrasileiros com um valor de p bastante próximo ao limiar de significância ($p=0,07$). Já para o gênero, não é observada tal diferença ($p=0,33$). Esses dados, assim como a escolaridade das amostras, estão compilados na tabela 1.

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

IDADE	PACIENTES			CONTROLES		
	Mínimo	Máximo	Média (dp)	Mínimo	Máximo	Média (dp)
	6	82	41,98 (17,19)	12	86	47,63 (15,26)
ETNIA	n	%		n	%	
eurobrasileiros	153	61,0		145	69,4	
afrobrasileiros	98	39,0		64	30,6	
GENERO	n	%		n	%	
masculino	116	46,2		107	51,2	
feminino	135	53,8		102	48,8	
ESCOLARIDADE	n	%		n	%	
analfabeto	56	22,3		30	14,4	
fundamental incompleto	129	51,4		113	54,1	
fundamental completo	22	8,8		28	13,4	
médio incompleto	13	5,2		8	3,8	
médio completo	18	7,2		16	7,7	
superior incompleto	5	2,0		2	1,0	
superior completo	0	0,0		5	2,4	
sem informação	8	3,2		7	3,3	

FONTE: O autor.

Extração de ácidos nucleicos

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos de sangue periférico através dos protocolos padrão de *salting out* ou fenol/clorofórmio. O RNA foi extraído a partir de células mononucleares de sangue periférico e de linfócitos T CD4⁺ através de colunas de sílica (RNeasy, Qiagen) em conformidade com as orientações do fabricante. Após a extração do RNA foi realizada a síntese de cDNA (High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems). As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas por centrifugação em barreira de densidade com Ficoll-Paque Plus (Amersham Bioscience) e a purificação das células T CD4⁺ foi realizada em colunas magnéticas utilizando o CD4 MultiSort Kit (Milteny Biotec).

Genotipagem

A genotipagem foi realizada através da plataforma SNPlexTM (Applied Biosystems). Essa tecnologia combina um ensaio de ligação de oligonucleotídeos com a técnica de PCR multiplex, seguidos por eletroforese capilar, de forma a conseguir uma amplificação específica e discriminar alelos de vários locos simultaneamente. Desse modo podem ser genotipados até 48 SNPs diferentes em uma única reação (Tobler et al., 2005).

Para esse ensaio foram selecionados inicialmente pouco mais de 300 polimorfismos, abrangendo diversos genes. Essas variantes foram definidas com base no trabalho de Malheiros (2009) sendo considerados inicialmente polimorfismos contidos em genes que estavam diferencialmente expressos em pelo menos uma das comparações realizadas. Polimorfismos em genes pertencentes a regiões genômicas com grande número de genes diferencialmente expressos ou relacionados (tanto funcionalmente como evolutivamente) a genes diferencialmente expressos também foram considerados. Esse conjunto foi então reduzido com base em alguns critérios:

I – Foram descartados pseudogenes ou genes sem qualquer função imune conhecida.

II – Só foram incluídos genes com polimorfismos para os quais já existia algum tipo de informação de frequência.

III – Polimorfismos em que o alelo menos comum não atingia a frequência de 10% também foram excluídos.

Desse modo o número de polimorfismos foi reduzido a cerca de 100. Desses, 48 foram selecionados para a realização do ensaio. Essa última seleção se deu com base em critérios técnicos e de sequência devido a limitações do método SNPLex e foi realizada em conjunto com o fabricante. Dos 48 polimorfismos genotipados, oito foram analisados no presente estudo.

Os procedimentos em laboratório foram realizados de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante e a eletroforese capilar foi realizada no aparelho 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Uma visão geral do método pode ser observada na figura 1.

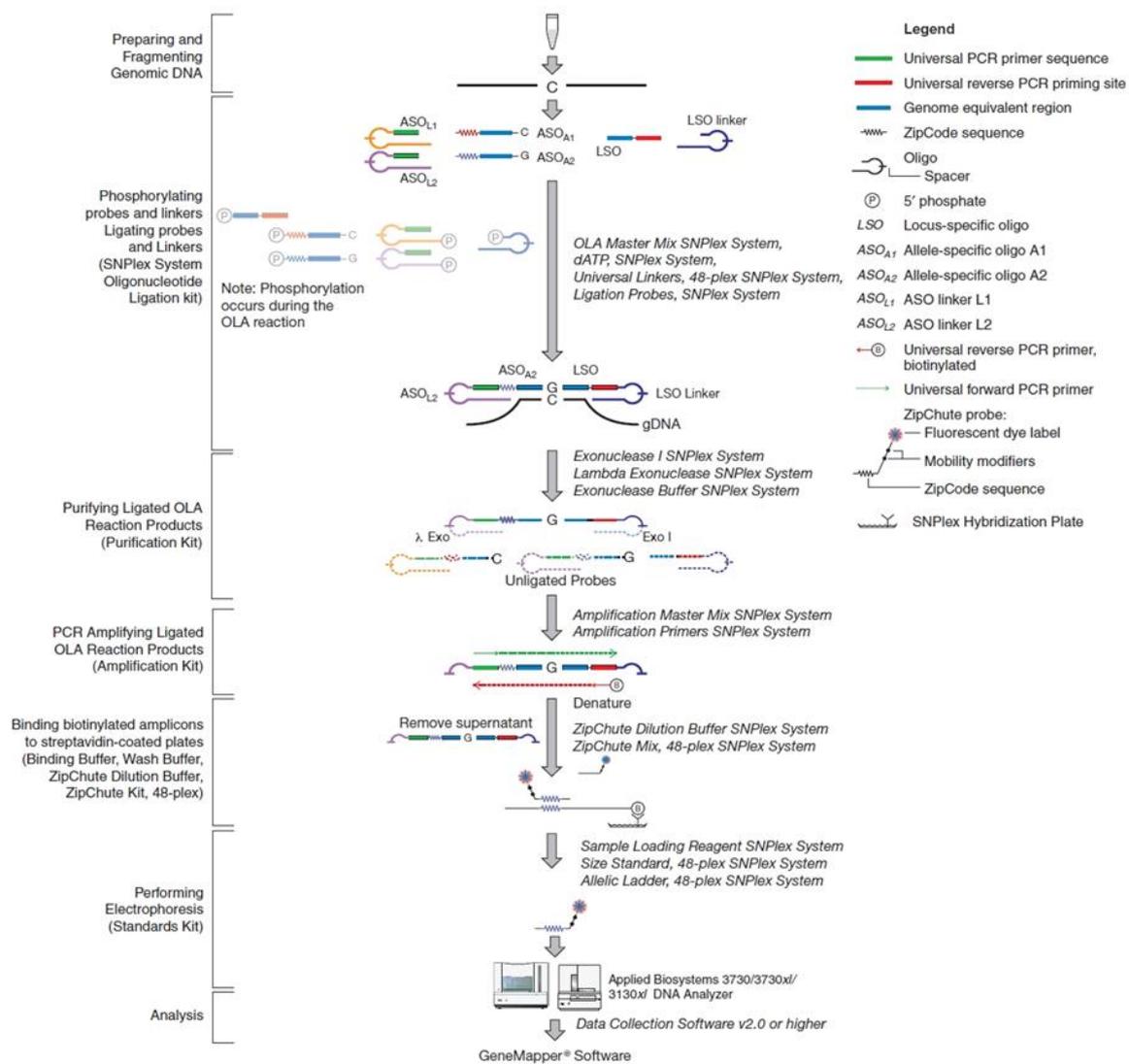


FIGURA 1 – VISÃO GERAL DO ENSAIO SNiPLEX.

FONTE: SNiPLEX™ Genotyping System 48-plex User Guide, Applied Biosystems.

Análise dos RNA mensageiro do gene NLRP12

Para a caracterização das diferentes isoformas de RNA mensageiro do gene *NLRP12* foi realizada uma amplificação por PCR a partir de cDNA. Foi utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores que hibridam em regiões que flanqueiam a porção variável entre os diferentes RNA mensageiros (5'ACACCCCAACTGCAAACCTTC 3'; 5'AGAGCCAGCAGATAGGACCA 3'). As condições de amplificação estão representadas na figura 2. Os fragmentos resultantes foram submetidos a uma eletroforese (gel de agarose 1,5%, 1:30h, 90V) e posterior coloração com brometo de etídio para a sua separação e identificação (Figura 3).

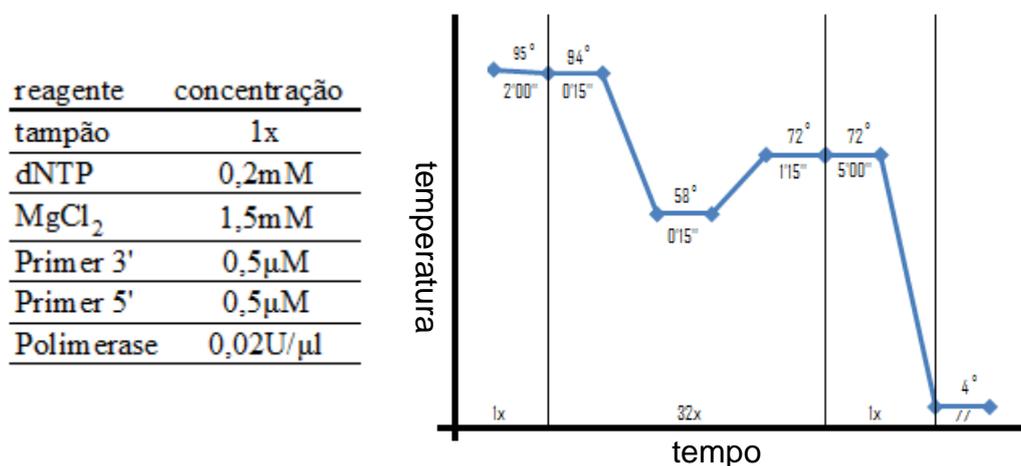


FIGURA 2– CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE PCR. A tabela à esquerda mostra as concentrações dos reagentes utilizados e o gráfico à direita, as condições de ciclagem.
 FONTE: O autor.

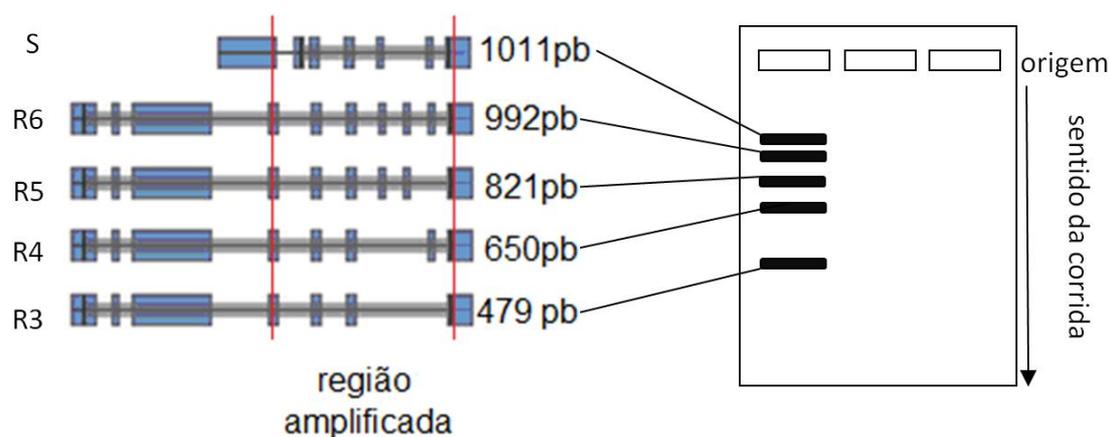


FIGURA 3 – REGIÃO AMPLIFICADA DOS DIFERENTES RNAs MENSAGEIROS DE NLRP12. Os oligonucleotídeos iniciadores foram projetados de forma a hibridarem com regiões comuns a todos os RNAs mensageiros, mas compreendendo uma região variável. As linhas vermelhas indicam as regiões onde se hibridam os oligonucleotídeos iniciadores. Os conjuntos das caixas em azul correspondem aos RNAs mensageiros. Essas regiões foram alinhadas esquematicamente apenas para facilitar a visualização dos segmentos compartilhados e dos que diferem entre os RNAs mensageiros.

FONTE: O autor.

Análise Estatística

As frequências alélicas, genotípicas e de portadores foram obtidas por contagem direta. Já as frequências haplotípicas foram obtidas após a inferência da fase gamética de alelos de mais de um loco através do algoritmo ELB com o auxílio do programa computacional ARLEQUIN v3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). O mesmo programa foi utilizado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo método de Guo e Thompson (GUO E THOMPSON, 1992). As análises de equilíbrio de ligação, com a obtenção dos valores de D , D' e r^2 foram realizadas segundo método descrito por Hedrick (HEDRICK, 1987).

As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre afro e eurobrasileiros para testar a diferenciação populacional. Tais comparações foram realizadas em tabelas de contingência 2x2 com o valor exato de p sendo obtido através do algoritmo metropolis, com o auxílio do programa computacional RxC (MILLER, 1997). Quando não foi detectada diferença para um dado loco, os dois estratos populacionais foram unidos para as

comparações envolvendo as amostras totais (pacientes afro e eurobrasileiros, controles afro e eurobrasileiros). Quando houve diferença entre os estratos, foi feito um ajuste nas amostras totais, mantendo a mesma proporção de afro e eurobrasileiros nos grupos de pacientes e controles. Para o ajuste foram excluídos da análise indivíduos do estrato populacional excedente, até que a razão afrobrasileiros / eurobrasileiros fosse a mesma no grupo de pacientes e no grupo controle. Essa exclusão se deu de forma aleatória (realizada através de sorteio).

Para as análises de associação os valores de *Odds Ratio* e o intervalo de confiança foram calculados segundo o método de Mantel-Haenszel (MANTEL e HAENSZEL, 1959) e os valores exatos de p via algoritmo metropolis (MILLER, 1997).