

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELEONORA PAULINI

**DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *HLA-DMA* E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM
O PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO**

CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELEONORA PAULINI

**DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *HLA-DMA* E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM
O PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio II em Biologia (BIO 027) como requisito parcial para a conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa.Dra. Maria Luiza Petzl-Erler

CURITIBA

2014

Só a dúvida salva”
Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Dino Umberto Paulini e Maria Leonor Fanini por todo o empenho dedicado em investir em minha educação, assim como por sempre terem me guiado pelo caminho do bem.

Aos meus amados irmãos Giovanni Paulini, Umberto Paulini e Isabella Paulini pela convivência harmoniosa e pelo carinho ao longo de todos estes anos juntos.

A Professora Maria Luiza Petzl-Erler pela oportunidade a mim concedida de fazer parte deste grupo de pesquisa, do qual me sinto privilegiada em fazer parte. Também pela dedicação a frente do Laboratório de Genética Molecular Humana ao longo destes anos, dedico a você meu reconhecimento.

Aos meus colegas de laboratório pelas brincadeiras diárias que tornam o ambiente mais agradável e também por compreenderem meu jeito peculiar de ser. Agradeço especialmente a Liana pelo ajuda com as otimizações; a Sheyla por me ensinar a analisar as sequências; a Ticianá, Marie e Aninha pela amizade; a Carol, Gabe, Eduardo e Luana também pelos momentos divertidos. Também agradeço aqueles que já saíram do laboratório: a Livia pela paciência em me ensinar as coisas quando eu não tinha experiência, espero poder me espelhar em você; a Márcia pela amizade desde que entrei no laboratório.

Ao meu namorado Adriano pela compreensão com minhas faltas e por todo o apoio que me deu nesta etapa de conclusão de curso. Se eu tivesse metade da dedicação que você tem com a pesquisa científica eu já estaria feliz. Dedico a você minha admiração pessoal e profissional, além de meu amor. Obrigada por existir.

A todos os indivíduos que doaram sangue para este tudo, meu muito obrigada!

RESUMO

O MHC (*Major Histocompatibility Complex*) humano é um complexo gênico localizado no braço curto do cromossomo seis. Nele são encontrados genes cujos produtos proteicos desempenham importantes funções no contexto da resposta imune. *HLA-DMA* está localizado na região de classe II do MHC e é responsável por codificar a cadeia alfa da molécula HLA-DM. Tal molécula regula a apresentação de antígenos a linfócitos T CD4+, tendo um papel central no controle da imunidade adaptativa. Alguns estudos anteriores reportaram associações fortes entre certos alelos de *HLA-DMA* e doenças autoimunes, ao passo que outros não replicaram as mesmas associações em amostras populacionais pertencentes a grupos étnicos distintos. Além de seu papel obscuro na autoimunidade, este gene é também pouco estudado em populações humanas. Este estudo teve, portanto, como objetivos: verificar se os diferentes alelos e/ou genótipos de *HLA-DMA* conferem susceptibilidade diferencial ao pênfigo foliáceo endêmico (PFE) em uma amostra miscigenada da população brasileira e também estimar as frequências alélicas e genotípicas deste gene em uma amostra de africanos (AF= 14) e outra de orientais (OR= 38). Para o estudo de associação um total de 135 indivíduos com PFE e 120 controles foram genotipados por sequenciamento direto do éxon 3 de *-DMA*. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas e genotípicas deste gene entre o grupo de pacientes de PFE e a amostra controle. Entretanto, uma tendência a um efeito protetor foi encontrada para o alelo *HLA-DMA*01:03* (OR= 0,28; $p= 0,06$). O aumento do tamanho amostral nos permitirá verificar se a significância estatística será ou não atingida. No que diz respeito ao estudo populacional, tanto para AF quanto para OR o alelo *DMA*01:01:01* foi o mais comum, atingindo sua maior frequência em africanos (96,4%). Duas variantes genéticas (154T>C e 180C>T) que podem caracterizar novos alelos de *HLA-DMA* foram também encontradas. Estas,entretanto, requerem uma validação posterior.

ABSTRACT

The human Major Histocompatibility Complex (MHC) is a complex located on the short arm of chromosome six. It contains genes whose functions are essential to the immune response. *HLA-DMA* maps to the class II region of the MHC and is responsible for encoding the alpha chain of the non-classical HLA-DM molecule. Such molecule regulates antigen presentation to CD4+ T cells, therefore playing a central role in adaptive immunity. Some previous studies have found strong associations between certain *HLA-DMA* alleles and autoimmune diseases, whereas others did not replicate the same results in other populations of distinct genetic backgrounds. Besides the controversial role of this gene in autoimmunity, *HLA-DMA* population studies are also scarce in the literature. Therefore, the aims of this study were: to verify whether *HLA-DMA* may confer differential susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (EPF) in a Brazilian population of mixed ancestry and to investigate *HLA-DMA* allele and genotypic frequencies for an African (AF=14) and an East Asian (EA = 38) sample. For the genetic association analysis a total of 135 subjects with EPF and 120 controls were genotyped using a set of in-house designed primers suitable for direct sequencing of *HLA-DMA* exon 3. There was no frequency difference for *HLA-DMA* alleles or genotypes between EPF and control subjects, indicating no association. Nonetheless, a trend towards protection was found for the allele *DMA*01:03* (OR= 0,28; $p= 0,06$). An increase in sample size will allow us to verify whether or not statistical significance will be reached. Regarding the population study, *DMA*01:01:01* was the most common allele in both EA and AF. In the latter it reached its highest frequency (96,4%). Two genetic variants (154 T>C and 180 C>T) which may characterize novel *HLA-DMA* alleles were also found. Nonetheless, in the aforementioned case the results require further validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano.....	16
Figura 2: Estrutura das moléculas HLA de classe I.....	17
Figura 3: Estrutura das moléculas HLA de classe II.....	18
Figura 4: Estrutura do MHC humano com dados do projeto ENCODE.	21
Figura 5: Rearranjos conformacionais de DR após a interação com HLA-DM.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos-iniciadores desenhados para este estudo e suas respectivas temperaturas de fusão (T _m).....	32
Tabela 2: Protocolo híbrido entre aqueles descritos para <i>HLA-A</i> e <i>-B</i> no manual do 13º Workshop Internacional de Histocompatibilidade.	32
Tabela 3: Oligonucleotídeos desenhados para a realização de reações de sequenciamento e suas respectivas temperaturas de fusão (T _m)	33
Tabela 4: Homogeneidade das frequências alélicas entre pacientes EURO-BR E AFRO-BR	35
Tabela 5: Homogeneidade das frequências alélicas entre controles EURO-BR E AFRO-BR	36
Tabela 6: Análise de associação de <i>HLA-DMA</i> com o PF para euro e afro-brasileiros	37
Tabela 7: Análise de associação de <i>HLA-DMA</i> com o PF agrupando as amostras de euro e afro-brasileiros	39
Tabela 1: Oligonucleotídeos-iniciadores desenhados para este estudo e suas respectivas temperaturas de fusão (T _m).....	32
Tabela 2: Protocolo híbrido entre aqueles descritos para <i>HLA-A</i> e <i>-B</i> no manual do 13º Workshop Internacional de Histocompatibilidade.	32
Tabela 3: Oligonucleotídeos desenhados para a realização de reações de sequenciamento e suas respectivas temperaturas de fusão (T _m)	33
Tabela 4: Homogeneidade das frequências alélicas entre pacientes EURO-BR E AFRO-BR	35
Tabela 5: Homogeneidade das frequências alélicas entre controles EURO-BR E AFRO-BR	36
Tabela 6: Análise de associação de <i>HLA-DMA</i> com o PF para euro e afro-brasileiros	37
Tabela 7: Análise de associação de <i>HLA-DMA</i> com o PF agrupando as amostras de euro e afro-brasileiros	39
Tabela 8: Frequências alélicas e genotípicas de <i>HLA-DMA</i> nas amostras de orientais e africanos analisadas.....	43

Tabela 9: Estudos de associação já realizados entre doenças autoimunes e <i>HLA-DMA</i>	43
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	PÊNFIGO FOLIÁCEO.....	13
2.2	O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE: SUBSIVISÃO E FUNÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA	15
2.3	ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS MHC DE CLASSE I e II.....	16
2.4	DEMAIS CARACTERÍSTICAS DO MHC HUMANO	18
2.5	HLA-DM: FUNÇÕES BIOLÓGICAS.....	21
2.6	IMPLICAÇÕES DE ALTERAÇÕES NO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE HLA-DM/DO PARA A AUTOIMUNIDADE	24
2.7	ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO JÁ REALIZADOS ENVOLVENDO <i>HLA-DMA</i> E DOENÇAS AUTOIMUNES	25
2.8	<i>HLA-DMA</i> : ESTRUTURA GÊNICA E ALELOS JÁ DESCRITOS	26
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA GENOTIPAGEM	28
4.2	AMOSTRA DE GENOTIPAGEM.....	29
4.3	DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS-INICIADORES E OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE.....	29
4.4	REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO	32
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO COM O PÊNFIGO FOLIÁCEO	35
5.2	RESULTADOS POPULACIONAIS.....	40
5.3	POSSÍVEL DESCRIÇÃO DE NOVOS ALELOS	40
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÃO.....	47
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

Estudos de associação genética podem auxiliar a melhor compreender os fatores genéticos que conferem susceptibilidade diferencial a determinadas patologias. Estudos caso-controle são amplamente utilizados com o propósito de se descobrir variantes genéticas que podem resultar em proteção ou susceptibilidade aumentada a determinadas doenças. Dentre as diferentes modalidades desta abordagem, destaca-se aquela em que genes candidatos são pré-selecionados tendo com critério o impacto de seus produtos gênicos na regulação de processos que podem estar envolvidos na patogênese da doença em análise.

Apesar dos avanços atuais observados na área de Genética Médica, com o advento dos GWAS (*Genome Wide Association Studies*, estudos de associação genômica ampla), não se deve menosprezar a importância do estudo de genes candidatos na elucidação da base genética das doenças. Dependendo do gene ou população de interesse, tal abordagem pode até ser mais apropriada do que aquela empregada pelos estudos de associação genômica ampla. Adicionalmente, após a extensiva análise de dados derivados de GWAS, com a identificação de variantes causativas, o resequenciamento das regiões gênicas consideradas como candidatas será inevitável (WILKENING et al., 2009).

Destaca-se também o papel dos estudos populacionais no planejamento e interpretação dos resultados obtidos a partir de estudos de associação genética. Ao saber que um certo alelo possui frequência baixa em uma dada população, por exemplo, constata-se de antemão que um tamanho amostral maior do que o empregado para variantes de maior frequência será necessário a fim de que as possíveis associações existentes sejam detectadas (SPENCER et al., 2009).

O pênfigo foliáceo endêmico é uma doença autoimune da epiderme, caracterizada pela presença de autoanticorpos contra uma caderina dos desmossomos, a desmogleína 1. O tratamento atual se baseia na utilização de corticoides sistêmicos, os quais resultam em diversos efeitos colaterais. Com o maior entendimento dos fatores etiológicos desencadeadores desta doença, novas estratégias de tratamento menos agressivas podem, eventualmente, ser desenvolvidas.

Neste trabalho analisamos o polimorfismo do gene *HLA-DMA* no grupo de pacientes com pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem) e em indivíduos controle.

Além disso, uma amostra de africanos e outra de orientais do leste asiático também foram genotipadas para este gene.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO

Pênfigo é um termo utilizado para descrever um grupo de doenças dentre as quais figura o pênfigo foliáceo (PF). O PF é uma doença autoimune cuja etiologia ainda não é totalmente conhecida. Os indivíduos acometidos pela doença produzem anticorpos IgG contra a desmogleína 1 (STANLEY et al., 1984; WARREN et al., 2000), uma caderina dos desmossomos localizada nas porções superiores da epiderme, fato este que leva a perda de adesão celular e a formação de bolhas intraepidérmicas. Tais bolhas tendem a se romper, dando lugar a superfícies erosivas, escamosas ou bolhas hemorrágicas. Autoanticorpos contra a desmogleína 3, principal autoantígeno do pênfigo vulgar (PV), também já foram detectados em pacientes com PF e podem contribuir para a patogênese desta última doença (ARTEAGA et al., 2002).

O PF apresenta uma forma endêmica, também denominada fogo selvagem (FS), e outra esporádica, esta também sendo chamada de Pênfigo de Cazenave. Acredita-se que tanto o FS quanto o Pênfigo de Cazenave apresentem manifestações clínicas semelhantes (CROSBY & DIAZ, 1993). A forma endêmica ocorre no Brasil prioritariamente em áreas rurais dos estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais. Homens e mulheres são acometidos pela doença em proporções semelhantes e a principal faixa etária de início do FS é aquela entre 10 e 30 anos de idade (revisado por ABRÉU-VÉLEZ et al., 2010). Formas endêmicas do PF também foram reportadas em outros países, como na Tunísia (KALLEL et al., 2004) e em El Bagre na Colômbia (ABRÉU-VÉLEZ et al., 2003).

Fatores ambientais capazes de explicar a restrição geográfica do FS já foram sugeridos. O mais contundente deles aponta para a ação de insetos hematófagos da família Simuliidae. Sabe-se que pacientes com PF apresentam anticorpos que reconhecem epítomos dos domínios EC1 (primeiro domínio extracelular) e EC2 (segundo domínio extracelular) da desmogleína 1. Por outro lado, indivíduos saudáveis, residentes em áreas endêmicas, e pacientes em estágio pré-clínico possuem anticorpos anti-EC5 contra a desmogleína 1. Tendo por base estas informações e as evidências de que pacientes com doenças transmitidas por vetores hematófagos também apresentam anticorpos anti-EC5, Li et al. (2003) propuseram

um modelo em que antígenos salivares de simulídeos reagem de forma cruzada com a desmogleína 1 levando, inicialmente, a produção de anticorpos anti-EC5. A este evento segue-se o espalhamento intramolecular de epítomos do domínio EC5 para os domínios EC1 e EC2 em indivíduos geneticamente susceptíveis.

A hipótese do mimetismo molecular tem como suporte adicional a evidência de redução de casos de FS em alguns estados, principalmente entre a década de 60 e 80, devido à urbanização. Esta última poderia afetar a exposição a certos fatores etiológicos (CHIOSSI & ROSELINO, 2001). Outros possíveis fatores ambientais de risco incluem o mercúrio, radiação ultravioleta e solventes orgânicos (ABRÉU-VÉLEZ et al., 2010).

No que diz respeito aos fatores genéticos que conferem susceptibilidade diferencial ao PF, as associações mais fortes até hoje reportadas ocorrem com alelos de genes localizados no MHC humano. Há certos alelos de *HLA-DRB1* que conferem proteção ao PF, ao passo que outros conferem susceptibilidade a doença (PAVONI et al., 2003). O possível efeito protetor do grupo alélico *DQ2* também já foi identificado (PETZL-ERLER & SANTAMARIA, 1989). Destaca-se, no entanto, que associações com genes localizados fora do MHC humano já foram descritas (DALLA-COSTA et al., 2010). A mais recente delas envolve os genes KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptors*). Observou-se que valores mais altos para as proporções de genes KIR ativadores em relação aos inibidores confere proteção ao PF (AUGUSTO et al., 2012).

Por fim, com relação ao tratamento atual empregado para o pênfigo foliáceo, a estratégia mais amplamente utilizada se baseia na administração de altas doses de corticoides orais com efeito sistêmico. Todavia, diversos efeitos colaterais associados a esta classe de medicamentos são comumente observados, dentre estes constam: osteoporose, diabetes melito, alterações emocionais, edema e outros.

2.2 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE: SUBSIVISÃO E FUNÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA

O MHC (*Major Histocompatibility Complex*) é uma região cromossômica com cerca de 4 Mb localizada no braço curto do cromossomo seis, mais especificamente na posição 6p21.31. As proteínas MHC são expressas nas células de vertebrados superiores. Elas foram inicialmente descritas em camundongos, onde foram chamadas de antígenos H-2. Nos humanos foram denominadas de antígenos HLA, já que foram inicialmente identificadas nos leucócitos (ALBERTS et al., 2004).

O MHC humano encontra-se historicamente dividido em três regiões (classe I, II e III) (FIGURA 1), muito embora um grupo de genes localizados na região de classe III seja por vezes referido como região de classe IV ou também região inflamatória (DEAKIN et al., 2006). A região de classe I é a mais telomérica e extensa de todas, ao passo que a região de classe II é a mais centromérica. A região de classe III, por sua vez, localiza-se entre as regiões de classe I e II (GREER et al., 2008). Diferentemente das demais não possui um grau de polimorfismo tão alto, apresentando variações de sequência que são típicas do genoma como um todo (XIE et al., 2003).

Os genes localizados na região MHC de classe I podem ser divididos em clássicos e não clássicos, sendo que a mesma divisão é válida para os de classe II. A região de classe I apresenta três genes HLA clássicos (*HLA-A*, *B*, e *C*), e três não clássicos (*HLA-E*, *-F* e *-G*), além de apresentar os genes *MICA* e *MICB* e 50 outros genes não HLA (GREER et al., 2008). A região de classe II apresenta como clássicos os genes *HLA-DP*, *-DQ*, e *-DR* e como não clássicos *HLA-DM* e *-DO* (TING & TROWSDALE, 2002). Salienta-se que os genes localizados no Complexo Principal de Histocompatibilidade são oriundos de uma série de eventos de duplicações e deleções gênicas, os quais culminaram na presença de *loci* que codificam proteínas estruturalmente similares entre si (DELARBRE et al., 1992; KULSKI et al., 2002).

Ainda no que diz respeito as moléculas clássicas e não clássicas, sabe-se que certas particularidades distinguem estas duas classes de proteínas HLA, estando dentre estas: a função biológica, o grau de polimorfismo e o padrão de expressão tecidual. As moléculas clássicas apresentam um grau mais elevado de polimorfismo quando comparadas com as não clássicas e estão envolvidas na apresentação de peptídeos a linfócitos T, além de serem críticas para a distinção

entre o próprio e não próprio (MAENAKA & JONES, 1999); as não clássicas, por sua vez, exercem um importante papel no contexto da imunidade inata, ainda que também participem da imunidade adaptativa (RODGERS & COOK, 2005).

É também válido ressaltar que moléculas HLA de classe I e II clássicas apresentam padrões de expressão tecidual e celular distintos: enquanto estas são encontradas na membrana plasmática de células apresentadoras de antígenos, ainda que sua expressão possa ser induzida em outros tipos celulares mediante a estimulação com citocinas específicas, aquelas são expressas por todas as células nucleadas do organismo (REITH et al., 2005).

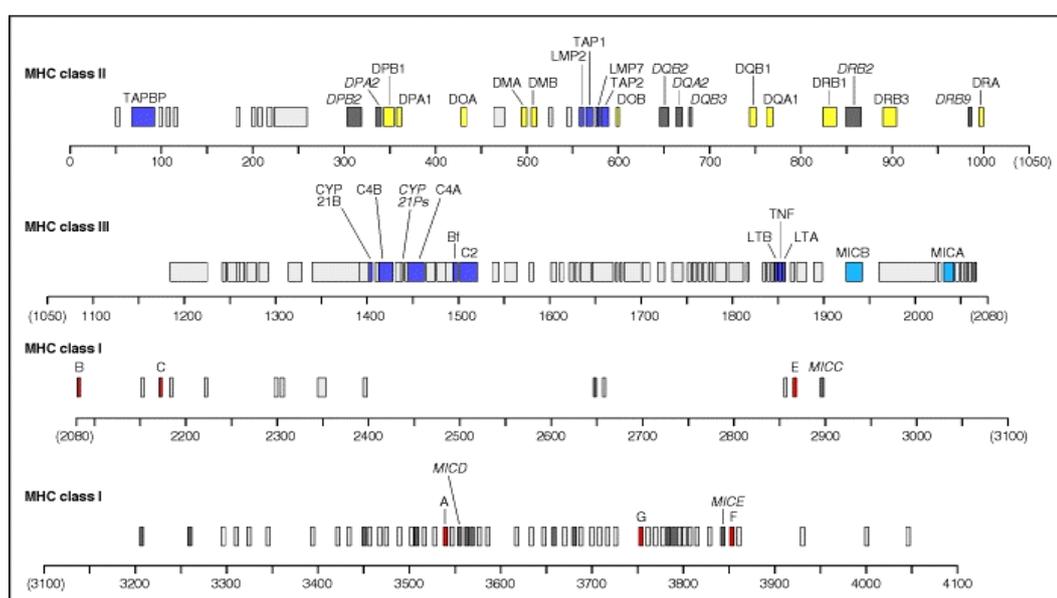


Figura 1: Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano. FONTE: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=imm&part=A574>.

2.3 ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS MHC DE CLASSE I e II

As moléculas MHC de diferentes classes diferem estruturalmente entre si. As de classe I são formadas por uma cadeia pesada transmembrana (formada pelos domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) (FIGURA 2), codificada pelo próprio gene HLA, associada a β -2 microglobulina (MAENAKA & JONES, 1999). Estas moléculas se ligam a peptídeos derivados de proteínas sintetizadas intracelularmente e os apresentam as células T que apresentam o co-receptor CD8 na membrana (KASAHARA et al., 1995). Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, os quais são altamente polimórficos, formam a

cavidade a qual o peptídeo se ligará (MAENAKA & JONES, 1999). Estes domínios são codificados pelos éxons dois e três dos genes HLA de classe I.

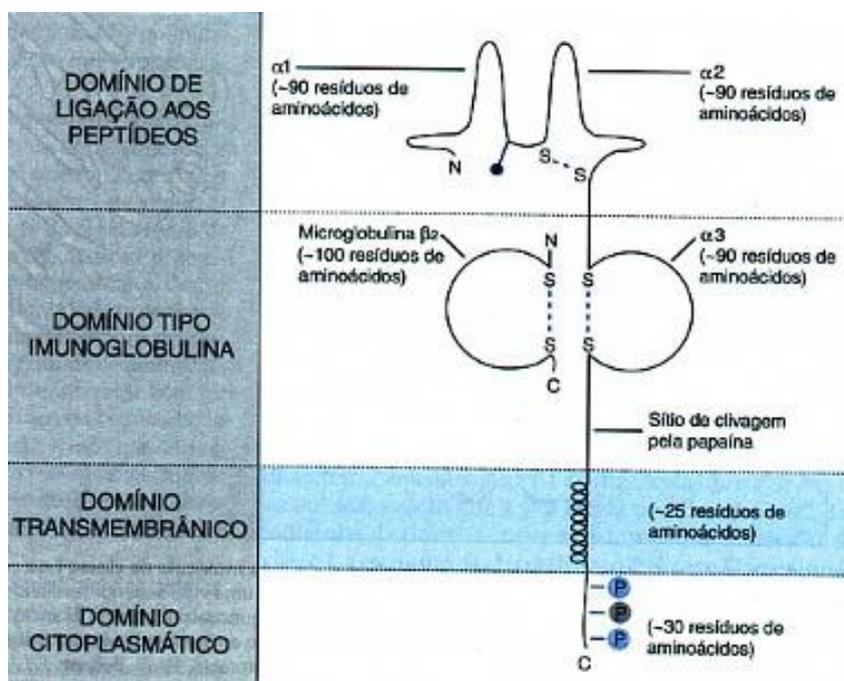


Figura 2: Estrutura das moléculas HLA de classe I (RETIRADO DE ABBAS et al., 1998)

As moléculas MHC de classe II são proteínas heterodiméricas formadas por uma cadeia alfa (domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e uma cadeia beta (domínios $\beta 1$ e $\beta 2$) (FIGURA 3). Ambas as cadeias são codificadas por genes HLA, sendo que a cadeia α apresenta cerca de 32 KDa e a β 29 KDa. Os genes HLA de classe II são ditos *HLA-D*, com as sub-regiões *P*, *N*, *M*, *O*, *Q* e *R*. Além disso, são também subdivididos em genes *HLA-D_A* e *HLA-D_B* (como, por exemplo, *HLA-DMA* e *HLA-DMB*), que codificam as cadeias α e β da molécula HLA, respectivamente.

O sulco de ligação a peptídeos no caso das moléculas HLA de classe II é formado pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ (MAENAKA & JONES, 1999). Estas moléculas apresentam peptídeos derivados de proteínas extracelulares, adquiridos por endocitose, as células T CD4+. Elas não são capazes de apresentar peptídeos sintetizados intracelularmente, uma vez que no retículo endoplasmático as moléculas MHC de classe II encontram-se associadas a uma cadeia invariável que bloqueia a cavidade de ligação a peptídeos (KASAHARA et al., 1995). No entanto, nem todas as moléculas de classe II têm a capacidade de apresentar peptídeos a células do sistema imune. HLA-DM e -DO não apresentam peptídeos, ao invés disso

modulam a apresentação de antígenos pelas moléculas clássicas (TING & TROWSDALE, 2002).

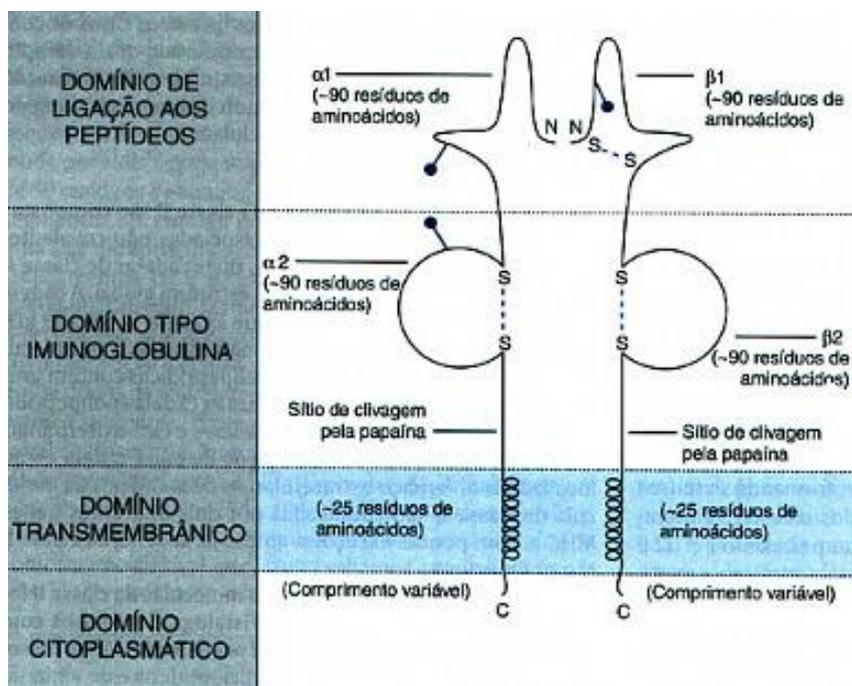


Figura 3: Estrutura das moléculas HLA de classe II (RETIRADO DE ABBAS et al., 1998)

2.4 DEMAIS CARACTERÍSTICAS DO MHC HUMANO

O complexo principal de histocompatibilidade já foi completamente sequenciado, sendo que inicialmente cerca de 220 genes foram identificados (MILNER & CAMPBELL, 2001) e após a realização do projeto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) este número foi refinado para 260 genes. Alguns dos achados do projeto ENCODE relativos às áreas transcritas do MHC humano, bem como o estado da cromatina em regiões genômicas compreendidas dentro da extensão deste complexo gênico são trazidas na Figura 4.

Um aspecto marcante do MHC humano é o forte desequilíbrio de ligação entre os genes que pertencem a este complexo. Este fenômeno é verificado quando certos alelos em diferentes *loci* ocorrem em conjunto com uma frequência maior ou menor daquela que seria esperada pelo acaso. Em outras palavras, é um fenômeno que diz respeito a não independência de alelos de diferentes *loci*, ou seja, a uma associação não aleatória (ARDLIE et al., 2002)

Outra característica marcante dos genes que codificam para as proteínas do MHC é seu elevado grau de polimorfismo. Estes são os genes mais polimórficos já

conhecidos nos vertebrados superiores, apresentando um grande número de alelos sem que haja predominância de qualquer um deles (ALBERTS et al., 2004). *HLA-B* é o gene mais polialélico dentre todos os localizados no MHC, apresentando mais de 3000 alelos já descritos e nomeados (IMGT/ HLA Database).

Diversas hipóteses foram criadas para explicar o alto nível de polimorfismo dos genes presentes no complexo principal de histocompatibilidade, dentre elas estão a de seleção dependente de frequência e a de seleção sobredominante. Esta última propõe que os indivíduos heterozigotos teriam a capacidade de apresentar uma maior variedade de peptídeos derivados de patógenos as células do sistema imune se comparados com os homozigotos (DE BOER et al., 2004), podendo desencadear, desta forma, uma resposta imune contra o organismo invasor.

Entretanto, como ressaltado por Penn (2002) a maioria dos estudos que forneceram evidências para corroborar tal hipótese possuem como entrave a dificuldade de distinguir uma possível vantagem adaptativa conferida pelo alto nível de heterozigosidade do MHC daquela propiciada pela heterozigosidade do genoma total. Notavelmente, ainda que estudos com linhagens de camundongos possam superar esta problemática, dada a pequena heterogeneidade genética encontrada entre estes animais, questiona-se a validade destes achados no contexto das populações humanas (revisado por ILMONEN et al., 2007)

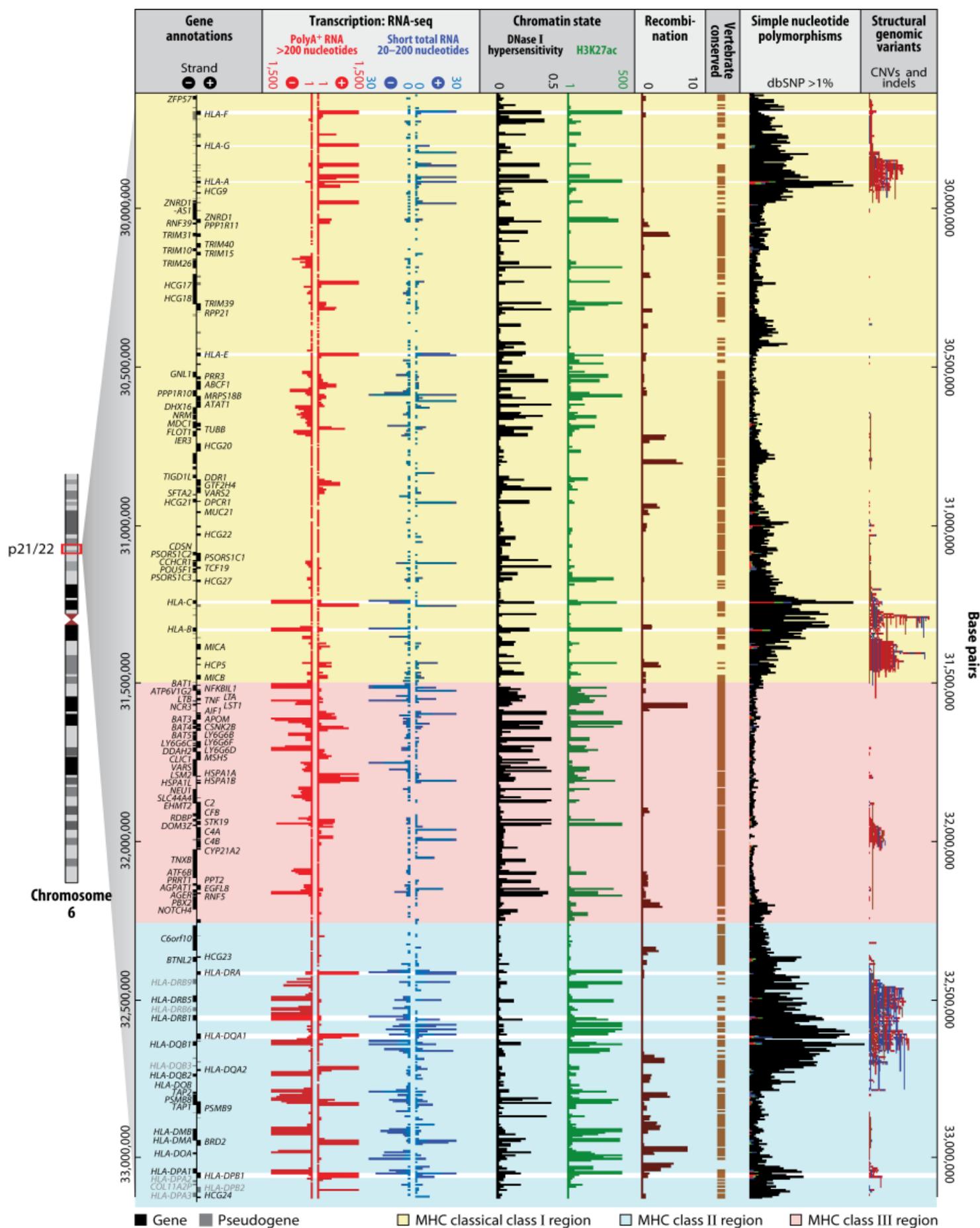


Figura 4: Estrutura do MHC humano com dados do projeto ENCODE. São trazidos dados relativos aos níveis transcricionais e ao estado da cromatina neste complexo gênico, retirados do projeto ENCODE, obtidos a partir do RNA isolado de linfócitos B CD20+. As regiões transcritas são mostradas para as diferentes fitas do DNA. A acessibilidade da cromatina, baseado no método de DNase-Seq, é mostrada em preto e é útil para direcionar o mapeamento de regiões reguladoras. A cor verde representa uma modificação específica da cromatina (a marca de ativação H3K27ac, boa indicadora da presença de acentuadores/enhancers). O mapa de recombinação, representado em marrom, foi obtido a partir do deCODE, representando taxas de recombinação calculadas utilizando janelas de 10Kb. Na sessão relativa à presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), a cor azul indica SNPs em regiões não traduzidas, o vermelho indica SNPs não sinônimos e o verde variantes sinônimas (retirado de TROWSDALE & KNIGHT, 2013).

Acredita-se também que a resistência a doenças seja um dos fatores que, dado a pressões seletivas, acaba por resultar em um elevado nível de variação genética no MHC humano. Entretanto, como mencionado por Trowsdale & Knight (2013) poucos são os exemplos de doenças infecciosas associadas a genes HLA, isto porque microorganismos possuem uma série de peptídeos capazes de serem apresentados a células do sistema imune por um grupo de várias moléculas HLA e não poucas moléculas específicas.

2.5 HLA-DM: FUNÇÕES BIOLÓGICAS

2.5.1 HLA-DM E A REMOÇÃO DO PEPTÍDEO CLIP

Uma das funções da molécula HLA-DM, codificada pelos genes *HLA-DMA* e *HLA-DMB*, é a remoção do peptídeo CLIP (*class-II associated invariant peptide*) do sulco de ligação a peptídeos de outras moléculas clássicas de classe II. Assim que as proteínas MHC de classe II são sintetizadas, já no retículo endoplasmático estas são associadas a uma cadeia invariável. Acredita-se que esta associação previna a ligação de peptídeos residentes do RE ao sulco das proteínas MHC-II. A cadeia invariável atua como uma chaperona, de modo a assegurar o correto dobramento das proteínas recém-sintetizadas. Além disso, ela apresenta uma sequência sinal específica de direcionamento para uma rota cujo destino final são vesículas intracelulares denominadas MIICs (*MHC class II compartments*) (revisado por TING & TROWSDALE, 2002).

Nestas vesículas a cadeia invariável é clivada por catepsinas, tais como as catepsinas L e S, deixando um fragmento da cadeia invariável chamado

CLIP obstruindo o sítio de ligação de peptídeos das moléculas MHC de classe II (RIESE & CHAPMAN, 1996; revisado por TING & TROWSDALE, 2002). HLA-DM facilita a remoção do CLIP, liberando assim o sulco de ligação a peptídeos das proteínas de classe II (DENZIN & CRESSWELL, 1995; SHERMAN et al., 1997).

A remoção do peptídeo CLIP por HLA-DM não deve, no entanto, ser compreendida como a função central/imprescindível desta molécula HLA. Para proteínas que se associam fracamente ao CLIP, a dissociação deste último pode ocorrer de maneira espontânea (POS et al., 2013). Similarmente, Ramachandra et al. (1996) demonstraram que a redução dos níveis de expressão de HLA-DM não afeta a taxa de dissociação do CLIP da fenda de moléculas HLA de classe II que interagem com uma afinidade fraca com HLA-DM, indicando que nestes casos baixos níveis de expressão são suficientes para a adequado remoção do CLIP do sulco de ligação a peptídeos. Por outro lado, a capacidade de HLA-DM de atuar como chaperona, estabilizando moléculas HLA que se encontram com a fenda vazia após a remoção do CLIP, é tida como a função central desta molécula não clássica. Na ausência de DM moléculas com o sulco vazio tendem a se agregar e se tornam funcionalmente inativas (KROPSHOFER et al., 1997). A atividade de chaperona de HLA-DM garante a apresentação de peptídeos, associados à fenda HLA, na superfície das células apresentadoras de antígenos.

Tendo como modelo a interação HLA-DM/HLA-DR1, Pos et al. (2012) demonstraram, a partir da cristalização deste complexo, o mecanismo pelo qual HLA-DM estabiliza outras moléculas HLA. A interação DM/DR1 leva a uma alteração conformacional de HLA-DR1: DR- α F51 é reposicionado para o *pocket* P1 (FIGURA 5), garantindo a estabilidade do complexo.

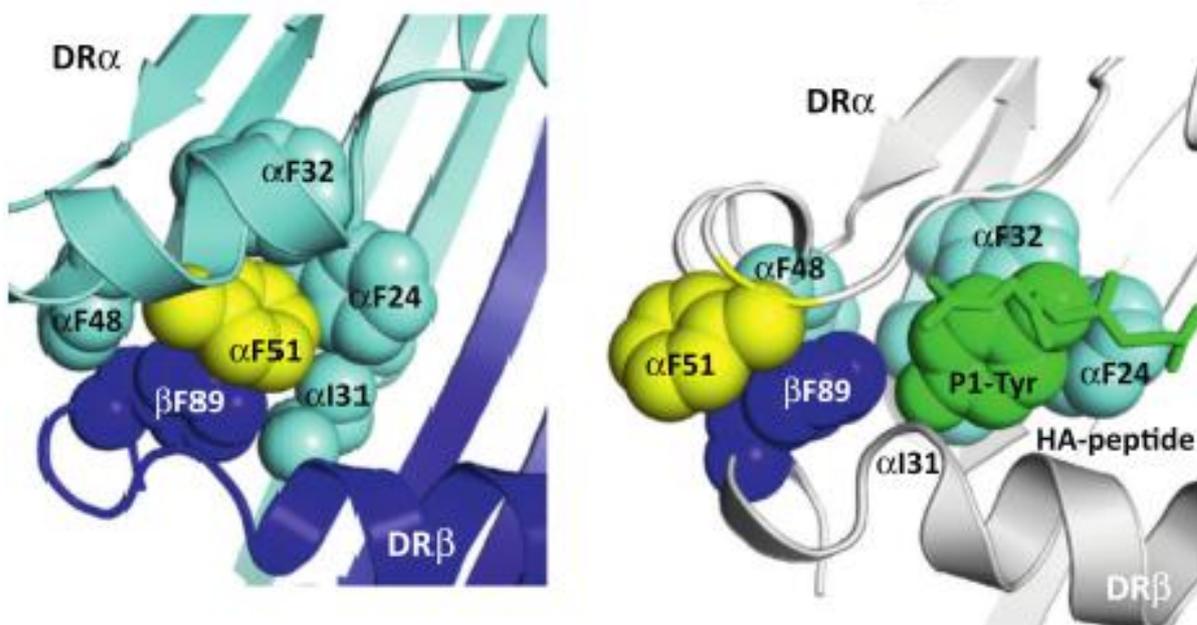


Figura 5: Rearranjos conformacionais de DR após a interação com HLA-DM. Do lado esquerdo mostra-se o rearranjo de aminoácidos causado após a interação DM/DR, de modo que o resíduo de aminoácido F51 da cadeia α de DR passa a ocupar o *pocket* P1. Do lado direito observa-se a interação de um peptídeo de alta afinidade derivado do vírus da hemaglutinina com o *pocket* P1, deslocando o resíduo α F51 para uma região mais distante da fenda da molécula HLA-DR.

2.5.2 HLA-DM E A “EDIÇÃO” DE PEPTÍDEOS

Uma importante função de HLA-DM é a chamada “edição de peptídeos”, evento este que ocorre após a remoção da partícula CLIP da fenda de moléculas HLA de classe II. Os peptídeos inicialmente associados à fenda de ligação das moléculas HLA de classe II clássicas são removidos e aqueles que se ligam com maior afinidade são então selecionados para permanecerem aderidos ao sulco da molécula HLA (POS et al., 2013).

HLA-DM é capaz de remover qualquer peptídeo da fenda de uma molécula HLA. Um bom exemplo disso é um peptídeo derivado da hemaglutinina do vírus influenza, o qual se liga a HLA-DR1 com um tempo de meia vida de 1 mês na ausência de HLA-DM e apenas 2 minutos na presença desta última molécula (PASHINE et al., 2003).

Com relação ao mecanismo pelo qual HLA-DM seleciona os peptídeos de maior afinidade, as modificações estruturais citadas na sessão anterior (aquelas envolvendo o resíduo de aminoácido DR- α F51) tornam parte da

fenda da molécula HLA de classe II inacessível a novos peptídeos que busquem se ligar nesta região, de modo que peptídeos de alta afinidade são selecionados por sua capacidade de competir com DR- α F51 pelo *pocket* P1 (FIGURA 5) (POS et al., 2012). Em outras palavras, como mencionado por Mellins & Stern (2014), a habilidade de um peptídeo de estabelecer uma forte interação com o pocket P1 é o que determina prioritariamente a resistência à ação de remoção da fenda catalisada por HLA-DM.

Desta forma, HLA-DM é capaz de exercer o mecanismo de “edição de peptídeos”, favorecendo aqueles que formem complexos de alta afinidade com moléculas HLA. Tais complexos permanecem por mais tempo na superfície da célula, aumentando a chance de interação destes com receptores de linfócitos.

2.6 IMPLICAÇÕES DE ALTERAÇÕES NO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE HLA-DM/DO PARA A AUTOIMUNIDADE

Sabe-se que HLA-DO é capaz de inibir a atividade de HLA-DM. O mecanismo pelo qual esta inibição ocorre foi recentemente elucidado por Guce et al. (2013): HLA-DO adota uma conformação semelhante aquela das moléculas HLA de classe II, interagindo lateralmente com HLA-DM e bloqueando seu sítio catalítico.

Estudos envolvendo camundongos NOD (*Non-Obese Diabetic Mice*, modelo animal da Diabetes Tipo I) - tal qual o de Yi et al. (2010) - demonstraram que a superexpressão de HLA-DO em células dendríticas (CDs), com consequente redução da atividade de HLA-DM, é capaz de bloquear o desenvolvimento da diabetes tipo I (DM1). Adicionalmente, os mesmos autores constataram que alterações no padrão de expressão de *HLA-DM/DO* em CDs alteram o grupo de peptídeos que se ligam as moléculas HLA de classe II, de modo a inibir a apresentação de certos peptídeos diabetogênicos a linfócitos T autoreativos. Tal fato causa o desaparecimento do quadro de DM1.

É também válido mencionar que Morgan et al. (2013), ao bloquearem a atividade de HLA-DM, observaram o desaparecimento do quadro característico de diabetes tipo I em camundongos NOD. Experimentos adicionais comprovaram a ausência de linfócitos TCD4+ autorreativos como sendo a

principal causadora da resistência a DM1. Conclui-se, portanto, que a função de HLA-DM é necessária para o desenvolvimento de células T autorreativas, as quais exercem um papel importante em respostas imunes contra o próprio.

Fallang et al. (2008) demonstraram que *HLA-DQ2*, grupo alélico que confere susceptibilidade diferencial a diversas doenças autoimunes, interage fracamente com HLA-DM. Baseado nos recentes achados de Fallang e colaboradores e nas evidências de que peptídeos derivados de autoantígenos interagem fracamente com moléculas HLA (SABATINO et al., 2011), Pos et al. (2013) propuseram que uma falha no processo de edição de peptídeos de baixa afinidade, devido a ação ineficiente de HLA-DM, pode ser um dos fatores que contribuem para a patogênese da autoimunidade.

2.7 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO JÁ REALIZADOS ENVOLVENDO *HLA-DMA* E DOENÇAS AUTOIMUNES

Estudos de associação envolvendo *HLA-DMA* e doenças autoimunes são relativamente escassos na literatura. Pinet et al. (1997), foram alguns dos primeiros autores a reportarem uma associação entre alelos de *HLA-DMA* e uma doença autoimune. Neste estudo o alelo *DMA*01:03* foi encontrado em maior frequência em caucasoides franceses portadores de artrite reumatoide (AR) em comparação com indivíduos controles, mesmo após o pareamento para genótipos de susceptibilidade de *HLA-DRB1*. Logo em seguida, Siegmund et al. (1999) ao analisarem uma amostra de controles e pacientes de DM1 residentes da Alemanha Central, caracterizaram *HLA-DMA*01:02* como um dos fatores genéticos que podem contribuir para a proteção a DM1. Tal associação mostrou-se independente de outros marcadores HLA de proteção à diabetes tipo I. Posteriormente, Pyo et al. (2005) reportaram uma associação positiva entre o alelo *HLA-DMA*01:02* e a psoríase em coreanos, sendo esta independente de *HLA-Cw*06:02*.

Ressalta-se, entretanto, que as associações encontradas em determinadas populações não necessariamente se replicam em outras. Um exemplo disto são os trabalhos de Yen et al. (1997) e Moxley & Han (2001), os quais demonstraram não haver associação entre os diferentes alelos de *HLA-DMA* e a AR em uma amostra de taiwaneses e outra de caucasoides dos

Estados Unidos, respectivamente. Outros resultados de ausência de associação incluem os trabalhos de Ristori et al. (1997), os quais investigaram o possível papel de *HLA-DMA* na patogênese da esclerose múltipla, e Yen et al. (1999). Estes últimos analisaram variantes polimórficas de *HLA-DMA* em pacientes taiwaneses de artrite reumatoide juvenil e indivíduos controle.

2.8 *HLA-DMA*: ESTRUTURA GÊNICA E ALELOS JÁ DESCRITOS

No que diz respeito à estrutura gênica de *HLA-DMA*, este gene é constituído por cinco éxons. O primeiro codifica um peptídeo líder, o segundo e o terceiro, respectivamente, os domínios intravesiculares da cadeia α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e o quarto a região transmembrana e também grande parte da extensão da cauda citoplasmática da cadeia α (NCBI Entrez Gene). No que diz respeito ao polialelismo e polimorfismo de *HLA-DMA*, este gene se destaca como um dos genes menos polialélicos da região de classe II do MHC humano, possuindo apenas sete alelos descritos até o momento. Dentre estes quatro diferem quanto à presença de variantes genéticas na região codificadora, sendo estes nomeadamente: *DMA*01:01:01*, *DMA*01:02*, *DMA*01:03* e *DMA*01:04*. Menciona-se também que o polimorfismo de *HLA-DMA* está inteiramente concentrado no éxon três deste gene (IMGT/ HLA Database).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A importante função imunológica exercida por HLA-DM ao modular a capacidade de apresentação de antígenos por moléculas MHC de classe II clássicas conjuntamente com a informação de que variações no padrão de expressão de DM influenciam o desenvolvimento de quadros de autoimunidade (YI et al., 2010; MORGAN et al., 2013) enquadram *HLA-DMA* como um bom candidato para estudos de associação com doenças autoimunes, dentre as quais está o pênfigo foliáceo. Além disso, devido aos resultados contraditórios encontrados em diferentes estudos de associação envolvendo doenças autoimunes e variantes genéticas deste gene, o possível papel desempenhado por *HLA-DMA* na patogênese da autoimunidade ainda permanece elusivo e deve ser testado.

No que diz respeito ao estudo populacional, sabe-se que em humanos os genes HLA mais intensamente estudados são aqueles ditos clássicos, sendo estes: *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRA*, *-DRB1*, *-DPA1*, *-DPB1*, *-DQA1*, *DQB1*. Vários estudos populacionais demonstraram que estes genes apresentam uma distribuição alélica diferencial em grupos étnicos distintos, sendo que determinados alelos HLA ocorrem em alta frequência apenas em algumas populações humanas (AGRAWAL et al., 2007). Entretanto, pouco se sabe sobre a distribuição alélica de genes não clássicos do MHC em populações de diferentes ancestralidades.

Adicionalmente, ao empregarmos a metodologia de sequenciamento temos a possibilidade de, eventualmente, descrevermos novos alelos para *HLA-DMA*. Os últimos trabalhos a empregarem tal técnica para a genotipagem de *HLA-DMA* foram os de Carrington et al. (1994) e Sanderson et al. (1994). Deste então nenhum outro estudo havia focado na análise de variantes deste gene por sequenciamento.

Portanto, este trabalho teve como objetivos verificar se os diferentes alelos e/ou genótipos de *HLA-DMA* conferem susceptibilidade diferencial ao PF e também investigar as frequências alélicas e genotípicas de *-DMA* em amostras de diferentes ancestralidades, sendo uma amostra de africanos e outra de orientais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA GENOTIPAGEM

4.1.1 CRITÉRIOS PARA A PRÉ-SELEÇÃO DE UM SUBGRUPO DE PACIENTES E CONTROLES DE PFE PARA A GENOTIPAGEM POR SEQUENCIAMENTO

A fim de se selecionar uma subamostra de pacientes e controles de PFE para a genotipagem do gene *HLA-DMA* pela metodologia de sequenciamento, os critérios listados logo abaixo foram adotados.

Exclusão de indivíduos consanguíneos da amostra pré-selecionada, uma vez que os dados de genotipagem destes não poderiam ser incluídos em análises a serem realizadas *a posteriori*. Tal observação leva em conta o fato de que de que indivíduos consanguíneos podem, eventualmente, compartilhar alelos idênticos por descendência;

Inclusão de indivíduos cujas amostras de DNA já estivessem genotipadas para outros genes HLA de classe II, a citar como exemplo *HLA-DR* e *HLA-DQ*. Desta forma, caso associações positivas ou negativas fossem encontradas neste estudo, análises futuras de desequilíbrio de ligação poderiam ser realizadas com o propósito de verificar se estas associações são dependentes ou não de outros marcadores HLA de classe II de susceptibilidade ou proteção ao PF.

Inclusão tanto de indivíduos de ancestralidade preponderantemente europeia quanto mestiça europeia/africana (abrangendo, portanto, indivíduos mulatos claros, médios e escuros). As proporções das diferentes classes de mulatos foram ajustadas no grupo de pacientes e controles de PFE, objetivando-se tanto evitar a ocorrência de associações espúrias quando no momento da análise dos dados quanto reduzir o número de exclusões de indivíduos da amostra de análise. Tais exclusões poderiam se fazer necessárias para que se fizesse um ajuste adequado das proporções das subclasses de mulatos entre pacientes e controles.

4.2 AMOSTRA DE GENOTIPAGEM

4.2.1 AMOSTRA DA ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

As frequências alélicas e genotípicas de *HLA-DMA* foram estimadas em um grupo de pacientes com pênfigo foliáceo endêmico e em indivíduos controle. A amostra controle foi composta por 120 indivíduos, ao passo que 135 pacientes compunham a amostra teste. As coletas para o grupo de pacientes com pênfigo foliáceo endêmico foram realizadas a partir do ano de 1997, majoritariamente no Hospital Adventista do Pênfigo, localizado em Campo Grande, MS. Para o grupo de indivíduos controle as coletas se iniciaram também em 1997 e foram também realizadas no Hospital Adventista do Pênfigo e em postos de saúde de Campo Grande.

Ressalta-se que este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da UFPR e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa).

4.2.2 AMOSTRA DO ESTUDO POPULACIONAL

Neste estudo, as frequências alélicas e genotípicas de *HLA-DMA* e *DMB* foram analisadas em duas amostras populacionais, sendo uma de orientais (OR= 38) e outra de africanos (AF= 14). A amostra de africanos analisada compreende indivíduos provenientes dos países Gana, Guiné Bissau, Angola e Camarões. Para estas amostras as coletas foram realizadas na cidade de Curitiba pelos próprios integrantes do LGMH, tendo início no ano de 2008. A amostra da população oriental, por sua vez, é composta por descendentes de japoneses que migraram para o Brasil nos últimos 103 anos.

4.3 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS-INICIADORES E OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

Empregou-se a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a amplificação *in vitro* do éxon 3 de *HLA-DMA*. Para tanto se fez necessária a utilização de oligonucleotídeos-iniciadores específicos para a sequência alvo (TABELA 1). Para o desenho de oligonucleotídeos-iniciadores partiu-se de

sequências consenso disponíveis no banco de dados IMGT/ HLA (<<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>>). Lançou-se mão tanto do software Primer3Plus (disponível em: <<http://www.bioinformatics.nl/primer3plus/>>), capaz de fornecer uma lista de todas as possíveis sequências de oligonucleotídeos-iniciadores adequados para amplificar um certa sequência alvo, quanto da ferramenta Oligo Analyzer (disponível em: <<http://idtdna.com/analyze/Applications/OligoAnalyzer/>>). Esta última foi empregada para a checagem dos parâmetros relativos à formação de estruturas secundárias. Uma vez tendo sido estes parâmetros verificados, procedeu-se para análise com a ferramenta NCBI-Primer BLAST (disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a qual permite detectar previamente a possibilidade da existência de ampliações inespecíficas.

A otimização dos protocolos de PCR, para que as ampliações fossem bem sucedidas e posteriormente o produto purificado destas reações pudesse ser empregado em reações de sequenciamento, também foi realizada. O DNA empregado nas reações em cadeia da polimerase já havia sido previamente extraído a partir de sangue total, através dos métodos fenol-clorofórmio-álcool isoamílico ou *salting-out*, que emprega o detergente NONIDET P-40 (LAHIRI e NURNBERGER, 1991), e a concentração para a realização de reações em cadeia da polimerase foi ajustada para 20 µg/ml.

O protocolo de amplificação para o éxon três de *HLA-DMA* foi otimizado, tendo sido utilizado como protocolo de partida um protocolo híbrido entre aqueles descritos para *HLA-A* e *-B* no manual do 13º Workshop Internacional de Histocompatibilidade (HANSEN, 2006) (TABELA 2). As reações em cadeia da polimerase para o éxon 3 de *HLA-DMA* foram realizadas para um volume final de 10 µl. Cada reação continha: tampão 1X (obtido de tampão Fermentas 10X constituído por: 750 mM Tris-HCl pH 8.8 a 25 °C, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % (v/v) Tween 20); dNTPs (Life Technologies, Foster City, EUA) 0,2 mM cada; MgCl₂ 2,0 mM; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo-iniciador específico; 0,02 U/µl de Taq polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá) e 40 ng de DNA genômico.

As condições de ciclagem empregadas neste caso foram as seguintes: 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 59,2 °C por 30 segundos, 72 °C por 60 segundos. Utilizou-se um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos

e um passo de extensão final a 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram executadas no termociclador Mastecycler **epgradient S** (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após a realização destas era feita uma eletroforese a 95 V por 30 minutos para controle da qualidade da PCR, aplicando-se 2,0 µl do produto de PCR misturado a 2,0 µl de tampão de carga com 0,2% de GelRed (Biotinum Inc., Hayward, EUA) em gel de agarose (Life Technologies, Foster City, EUA) a 1,0%. Os produtos de PCR nos géis foram visualizados no transiluminador de luz ultravioleta LumiBIS (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém, Israel) e fotografados através de um sistema de fotodocumentação computadorizado.

Tabela 1: Oligonucleotídeos-iniciadores desenhados para este estudo e suas respectivas temperaturas de fusão (T_m). Os oligonucleotídeos-iniciadores denominados como F (do inglês *forward*) hibridam na fita 5-3', ao passo que os designados R (do inglês *reverse*) hibridam na fita 3-5

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5'-3'	T_m (°C)
DMA EX3 PCR F_	TTGCCTGGAA GAAGACCTCC	56,9
DMA EX3 PCR R_	GGAAATGACGTGGGTGTCTG	56,0

Tabela 2: Protocolo híbrido entre aqueles descritos para *HLA-A* e *-B* no manual do 13º Workshop Internacional de Histocompatibilidade.

Workshop - Protocolo Híbrido	Concentração inicial		Concentração final	
Tampão sulfato	10	X	1	X
Deoxinucleotídeos	2	mM	0,2	mM
Cloreto de Magnésio	25	mM	1,5	mM
Oligonucleotídeo Iniciador <i>forward</i>	20	μ M	0,2	μ M
Oligonucleotídeo Iniciador <i>reverse</i>	20	μ M	0,2	μ M
Taq DNA Polimerase	5	U/ μ l	0,02	U/ μ l
Ácido desoxirribonucleico	20	μ g/ml	4	μ g/ml

4.4 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Anteriormente à realização das reações de purificação e sequenciamento, os produtos de PCR eram quantificados utilizando-se 2 μ l do marcador Gene Ruler 1Kb (Fermentas, Burlington, Canadá), também aplicado no gel de agarose 1% juntamente com o tampão de carregamento contendo Gel Red. As bandas dos amplicons foram quantificadas por comparação com as bandas do marcador, e foram escolhidos para sequenciamento aquelas que tinham uma concentração entre 100 e 150 ng. Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de sequenciamento foram distintos daqueles utilizados para amplificação, sendo que suas sequências são trazidas na Tabela 3. Até o momento as reações de sequenciamento foram feitas em uma única direção,

entretanto pretende-se sequenciar futuramente um subgrupo de indivíduos em ambas as direções.

Tabela 3: Oligonucleotídeos desenhados para a realização de reações de sequenciamento e suas respectivas temperaturas de fusão (T_m). Os oligonucleotídeos denominados como F (do inglês forward) hibridam na fita 5-3', ao passo que os designados R (do inglês reverse) hibridam na fita 3-5

Oligonucleotídeo	Sequência 5-3'	T _m (°C)
DMA ex3 seq_F	CC TCCAAACACA GAGATACCAT	56,6
DMA ex3 seq R_	GAT GGG CTT AGG GTA GGA ATG	54,1

Os produtos de PCR foram purificados para eliminar os reagentes em excesso e tornar viável a reação de sequenciamento. Para esse fim foram utilizadas 4 U da enzima Exonuclease I (Fermentas, Burlington, Canadá) e 0,7 U da enzima Fastap (Thermo Scientific, Waltham, EUA), em um volume final de 2 µl. As condições de ciclagem foram: ativação enzimática a 37 °C por 45 minutos e inativação enzimática a 80 °C por 15 minutos. Para as reações de sequenciamento, utilizou-se 1 µl de Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Life Technologies, Foster City, EUA), 0,5 µl de oligonucleotídeo a uma concentração inicial de 10pmol/µl, 3 µl de Big Dye® Terminator v. 1.1, v. 3.1 5X Sequencing Buffer e 1 µl de produto de PCR purificado, em um volume final de 10 µl. Essas reações foram realizadas em placas de reação de 96 poços Microamp® Optical (Life Technologies, Foster City, EUA).

As condições de ciclagem consistiram em uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto; seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 2 minutos. Após a reação de sequenciamento, uma nova purificação foi realizada antes da injeção das amostras no sequenciador. Para a precipitação do DNA foi adicionado 2,5 µl de EDTA (Merck, Frankfurt, Alemanha) 125 mM e 30 µl de etanol absoluto (Merck, Frankfurt, Alemanha). Após a incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, seguiu-se uma centrifugação a 3220 G por 45 minutos a 15 °C. A placa é então virada bruscamente para descartar o sobrenadante e centrifugada invertida rapidamente até 300 G. São adicionados 30 µl de etanol 70% à temperatura ambiente e é feita uma centrifugação a 2500

G por 5 minutos a 25 °C. O sobrenadante é novamente descartado e a placa é centrifugada invertida até 300 G. Antes de armazenar a placa a -20°C com a septa para placas de 96 poços (Life Technologies, Foster City, EUA), esta foi deixada aberta, coberta com papel alumínio, à temperatura ambiente por 30 minutos, para que todo o álcool evaporasse. As amostras foram, então, ressuspensas em 10 µl de Hi-Di Formamide (Life Technologies, Foster City, EUA).

As corridas de sequenciamento foram realizadas no sequenciador 3500xl Genetic Analyzer (Life Technologies, Foster City, EUA) que utilizou os seguintes reagentes: POP-7 Polymer for 3500/3500xl Genetic Analyzers, Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series, Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series e Conditioning Reagent 3500 Series (todos da Life Technologies, Foster City, EUA). A visualização dos cromatogramas, a análise da qualidade das sequências e o alinhamento foram realizados através dos programas Chromas Lite versão 2.01 (Technelysium, Brisbane, Austrália) e Mutation Surveyor® DNA Variant Analysis Software versão 3.30 (Softgenetics, State College, EUA).

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as diferentes amostras populacionais analisadas, as frequências alélicas e genótípicas foram estimadas por contagem direta. No que se refere às análises de associação, as diferenças entre as frequências alélicas e genótípicas do grupo de pacientes com PFE e a amostra de indivíduos controle foram testadas através do teste exato de Fisher, utilizando a ferramenta computacional MedCalculator (Disponível em: <<http://www.medcalc.org>>). Também foi realizado o cálculo de OR (*odds ratio*) que nos dá a razão de chances, com um intervalo de confiança (IC) igual a 95%. O IC 95% juntamente com o valor de *p* obtido pelo teste exato de Fisher fornecem informações sobre a significância das diferenças obtidas entre pacientes e controles. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para as frequências genótípicas foi realizado de acordo com o método de Guo e Thompson (1992) utilizando o pacote de programas ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO COM O PÊNFIGO FOLIÁCEO

Neste trabalho foram genotipados 135 pacientes de pênfigo foliáceo e 120 indivíduos pertencentes a uma amostra controle. Inicialmente tanto o grupo de pacientes quanto o de controles foi dividido em euro-brasileiros (EURO-BR) e afro-brasileiros (AFRO-BR). Realizou-se, então, um teste de homogeneidade a fim de se verificar a possibilidade de agrupamento destas subamostras. Tanto para controles quanto pacientes, tal teste não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas dos dois grupos étnicos citados anteriormente (TABELAS 4 e 5). Ainda que as frequências alélicas sejam homogêneas entre euro e afrodescendentes, uma análise em separado destes dois subgrupos permite observar as diferentes tendências de aumento ou diminuição de frequências em cada um deles (TABELA 6). Entretanto, a fim de se obter resultados para a população total e o maior poder estatístico possível, realizou-se o agrupamento das amostras EURO e AFRO-BR tanto no grupo de controles quanto de pacientes de pênfigo.

Tabela 4: Homogeneidade das frequências alélicas entre pacientes EURO-BR E AFRO-BR

	Pacientes				<i>p</i>
	EURO-BR		AFRO-BR		
	n = 81	%	n = 54	%	
<i>DMA*01:01:01</i>	126	77,8	91	84,3	0,19
<i>DMA*01:02</i>	29	17,9	15	13,9	0,38
<i>DMA*01:04</i>	4	2,5	2	1,9	0,74
<i>DMA*01:03</i>	3	1,9	0	0	0,30

Tabela 5: Homogeneidade das frequências alélicas entre controles EURO-BR E AFRO-BR

	Controles				p
	EURO-BR n = 74		AFRO-BR n = 46		
		%		%	
<i>DMA*01:01:01</i>	119	80,4	70	76,1	0,42
<i>DMA*01:02</i>	19	12,8	19	20,7	0,10
<i>DMA*01:04</i>	2	1,4	2	2,2	0,63
<i>DMA*01:03</i>	8	5,4	1	1,1	0,12

Após o agrupamento dos subgrupos AFRO-BR e EURO-BR, a análise de associação revelou não haver diferenças estatisticamente significativas ao se comparar as frequências alélicas e genóticas de *HLA-DMA* entre pacientes e controles. Entretanto, o alelo *DMA*01:03* encontra-se presente em 1,1 % dos pacientes e 3,8% dos controles, uma diferença próxima ao limite de significância ($p = 0,06$). No que diz respeito à análise de equilíbrio de Hardy Weinberg (HW), tanto para pacientes quanto para controles desvios significativos dos valores esperados em equilíbrio para as frequências genóticas não foram observados (TABELA 7). Dados adicionais relativos a análises de associação após a junção das amostras EURO/AFRO são trazidos na Tabela 7.

Tabela 6: Análise de associação de *HLA-DMA* com o PF para euro e afro-brasileiros

Alelo/Genótipo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	<i>p</i>
AFRO-BR	n= 54		n= 46				
<i>DMA*01:01:01</i>	91	84,3	70	76,1	1,68	0.83 - 3.40	0,15
<i>DMA*01:02</i>	15	13,9	19	20,7	0,62	0.29 - 1.30	0,21
<i>DMA*01:03</i>	0	0,0	1	1,1	0,28	0.01- 7.05	0,44
<i>DMA*01:04</i>	2	1,9	2	2,2	0,85	0.12 - 6.15	0,87
<i>DMA*01:01:01+</i>	54	100,0	41	89,1	14,44	0.77- 68.68	0,07
<i>DMA*01:02+</i>	15	27,8	16	34,8	0,65	0.27 - 1.53	0,33
<i>DMA*01:03+</i>	0	0,0	1	2,2	0,29	0.01 - 7.28	0,45
<i>DMA*01:04+</i>	2	3,7	2	4,3	0,85	0.11 - 6.26	0,87
<i>DMA*01:01:01/01:01:01</i>	37	68,5	29	63,0	0,93	0.37 - 2.34	0,89
<i>DMA*01:01:01/01:01:02</i>	15	27,8	11	23,9	1,00	N.A	N.A
<i>DMA*01:01:01/01:01:03</i>	0	0,0	1	2,2	0,25	0.009 - 6.64	0,40
<i>DMA*01:01:01/01:01:04</i>	2	3,7	0	0,0	3,70	0.16 - 84.92	0,41
<i>DMA*01:02/01:01:02</i>	0	0,0	3	6,5	0,10	0.005 - 2.26	0,15
<i>DMA*01:02/01:01:04</i>	0	0,0	2	4,3	0,15	0.006 - 3.39	0,23
<i>DMA*01:03/01:01:03</i>	0	0,0	0	0,0	N.A	N.A	N.A
EURO-BR	n= 81		n= 74				
<i>DMA*01:01:01</i>	126	77,8	119	80,4	0.85	0.49 - 1.48	0,57
<i>DMA*01:02</i>	29	17,9	19	12,8	1,48	0.79 - 2.77	0,22
<i>DMA*01:03</i>	3	1,9	8	5,4	0,33	0.09 - 1.27	0,11

Alelo/Genótipo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	<i>p</i>
EURO-BR							
<i>DMA*01:04</i>	4	2,5	2	1,4	1,85	0.33 - 10.24	0,48
<i>DMA*01:01:01+</i>	78	96,3	73	98,6	0,36	0.04 - 3.50	0,38
<i>DMA*01:02+</i>	26	32,1	21	28,4	1,19	0.59 - 2.37	0,61
<i>DMA*01:03+</i>	3	3,7	1	1,4	2,80	0.28 - 27.60	0,38
<i>DMA*01:04 +</i>	4	4,9	2	2,7	1,87	0.33 - 10.52	0,48
<i>DMA*01:01:01/01:01:01</i>	48	59,3	46	62,2	0,86	0.41 - 1.78	0,69
<i>DMA*01:01:01/01:02</i>	23	28,4	19	25,7	1,00	N.A	N.A
<i>DMA*01:01:01/01:03</i>	3	3,7	6	8,1	0,41	0.09 - 1.87	0,25
<i>DMA*01:01:01/01:04</i>	4	4,9	2	2,7	1,65	0.27 - 10.02	0,58
<i>DMA*01:02/01:02</i>	3	3,7	0	0,0	5,80	0.28 - 119.43	0,25
<i>DMA*01:02/01:04</i>	0	0,0	0	0,0	N.A	N.A	N.A
<i>DMA*01:03/01:03</i>	0	0,0	1	1,4	0,27	0.01 - 7.18	0,44

NOTA: OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança a 95%; N.A: não aplicável

*DMA*01:01:01+*, *DMA*01:02+*, *DMA*01:03+* e *DMA*01:04+* indicam os indivíduos que possuem o alelo em homo ou heterozigose

Tabela 7: Análise de associação de *HLA-DMA* com o PF agrupando as amostras de euro e afro-brasileiros

Alelo/Genótipo	Pacientes	%	Controles	%	OR	IC (95%)	<i>p</i>
	n= 135		n= 120				
<i>DMA*01:01:01</i>	218	80,7	189	78,8	1,13	0.73 - 1.74	0,58
<i>DMA*01:02</i>	43	15,9	38	15,8	1	0.62 - 1.62	0,98
<i>DMA*01:03</i>	3	1,1	9	3,8	0,28	0.07 - 1.07	0,06
<i>DMA*01:04</i>	6	2,2	4	1,7	1,34	0.37 - 4.81	0,65
<i>DMA*01:01:01+</i>	132	97,8	114	95,0	2,31	0.56 - 9.47	0,25
<i>DMA*01:02+</i>	41	30,4	35	29,2	1,06	0.61 - 1.81	0,86
<i>DMA*01:03+</i>	3	2,2	8	6,7	0,32	0.08 - 1.22	0,10
<i>DMA*01:04+</i>	6	4,4	4	3,3	1,35	0.37 - 4.89	0,65
<i>DMA*01:01:01/01:01:01</i>	85	63,0	75	62,5	1		
<i>DMA*01:01:01/01:01:02</i>	38	28,1	30	25,0	1,11	0.63 - 1.97	0,7
<i>DMA*01:01:01/01:01:03</i>	3	2,2	7	5,8	0,38	0.09 - 1.51	0,17
<i>DMA*01:01:01/01:01:04</i>	6	4,4	2	1,7	0,64	0.51 - 13.51	0,24
<i>DMA*01:02/01:02</i>	3	2,2	3	2,5	0,88	0.17 - 4.50	0,88
<i>DMA*01:02/01:04</i>	0	0,0	2	1,7	0,18	0.008 - 3.73	0,26
<i>DMA*01:03/01:03</i>	0	0,0	1	0,8	0,29	0.01 - 7.33	0,46
<i>p-HW</i>	0,87		0,13				

NOTA: OR: "odds ratio"; IC: intervalo de confiança a 95%; *p-HW*: valores de probabilidade para o equilíbrio de Hardy Weinberg

*DMA*01:01:01+*, *DMA*01:02+*, *DMA*01:03+* e *DMA*01:04+* indicam os indivíduos que possuem o alelo em homo ou heterozigose

5.2 RESULTADOS POPULACIONAIS

Ao genotiparmos a amostra de africanos e a de orientais, constatamos que o alelo *DMA*01:01:01* é o mais frequente em ambas as amostras, com frequências de, respectivamente, 96,4% e 82,9%. O alelo *DMA*01:02* tem sua maior frequência em orientais (14,5%) e está presente em apenas 3,6 % dos africanos, ao passo que o alelo *DMA*01:03* não foi encontrado na amostra AF. Quanto as frequências genóticas, o genótipo homocigoto para *DMA*01:01:01* é o mais comum tanto em AF quanto em OR, seguido por *DMA*01:01:01/01:02*. Para ambas as amostras as frequências genóticas estão em equilíbrio de Hardy Weinberg (Tabela 8).

Tabela 8: Frequências alélicas e genóticas de *HLA-DMA* nas amostras de orientais e africanos analisadas

	OR		AF	
	n= 38	%	n=14	%
<i>DMA*01:01:01</i>	63	82,9	27	96,4
<i>DMA*01:02</i>	11	14,5	1	3,6
<i>DMA*01:03</i>	2	2,6	0	0
<i>DMA*01:01:01/01:01:01</i>	25	32,9	27	92,9
<i>DMA*01:01:01/01:02</i>	11	14,5	1	7,1
<i>DMA*01:01:01/01:03</i>	2	2,6	0	0
<i>P-HW</i>	0,7		1	

NOTA: *P-HW*, valor de *p* para o equilíbrio de Hardy Weinberg

5.3 POSSÍVEL DESCRIÇÃO DE NOVOS ALELOS

Ao sequenciarmos indivíduos pertencentes à amostra de pacientes e controles de pênfigo, detectamos a presença de duas variantes genéticas ainda não descritas. Uma delas está presente no códon 180 (180C>T) de *HLA-DMA*. Esta variante foi encontrada em três indivíduos pertencentes ao grupo de pacientes de PF, sendo dois indivíduos de ancestralidade mestiça europeia/africana e um cuja ancestralidade é preponderantemente europeia. Tal variação de nucleotídeo não altera a sequência de aminoácidos da cadeia α de HLA-DM, sendo, portanto, sinônima. A outra variante está localizada no códon 154 (154T>C) e também não resulta em substituição de aminoácido. Esta última foi encontrada em um indivíduo

de ancestralidade mestiça europeia/africana. As variantes aqui mencionadas, entretanto, requerem uma posterior validação.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, não detectamos diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas, genotípicas e de portadores de alelos de *HLA-DMA* entre pacientes de pênfigo foliáceo e indivíduos controles. Alguns valores de p próximos ao limiar de significância foram obtidos, entretanto ao se realizar múltiplas comparações estatísticas independentes entre duas amostras alguns valores de probabilidade baixos são esperados. Ainda assim o aumento do tamanho amostral, o qual pode ou não levar ao alcance da significância estatística em casos em que o valor de p é próximo de 0,05, é válido.

Pinet et al. (1997) e Sang et al. (2005) reportaram associações positivas entre o alelo *DMA*01:03* e, respectivamente, a artrite reumatoide e a diabetes tipo I. Na amostra de pacientes e controles de pênfigo observou-se uma tendência de redução da frequência deste alelo em pacientes acometidos pelo PF (OR= 0,28; $p=$ 0,06). Não é incomum que para diferentes doenças autoimunes, tendências distintas de variações nas frequências alélicas sejam observadas. Além disso, como demonstrado por Carlson et al. (2013) para uma mesma doença autoimune é possível que certos alelos associados a doença em determinados grupos étnicos mostrem as mesmas tendências mas com diferentes graus de magnitude em outros, ou até mesmo tendências opostas.

Em outros estudos de associação já realizados com doenças autoimunes, entretanto, diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas e genotípicas de *HLA-DMA* em pacientes e controles não foram encontradas (YEN et al., 1997; RISTORI et al., 1997; REVIRON et al., 1999; YEN et al., 1999; MOXLEY & HAN, 2001). Para alelos cujas frequências são baixas nas diferentes populações humanas, como é o caso de *DMA*01:03*, é de se esperar que um tamanho (n) amostral maior do que o utilizado em alguns estudos (RISTORI et al., 1997; MOXLEY & HAN, 2001) seja necessário para que associações com esta variante alélica sejam constatadas. Todavia, caso as associações observadas sejam fortes o requerimento de um n amostral maior não se faz necessário. A Tabela 9 traz mais informações sobre os estudos de associação realizados até o momento entre *HLA-DMA* e doenças autoimunes.

Tabela 9: Estudos de associação já realizados entre doenças autoimunes e *HLA-DMA*

	Yen et al. 1999	Yen et al. 1997	Pyo et al. 2003
Doença	Artrite reumatoide juvenil	Artrite reumatoide	Psoríase
População	Taiwaneses	Taiwaneses	Coreanos
Alelo e/ou genótipo associado	N.A	N.A	<i>DMA*01:02</i> e <i>DMA*01:01/01:01</i>
Tipo de associação encontrada	Ausência de associação	Ausência de associação	Susceptibilidade e proteção OR= 1,94 e $p < 0,001$, OR= 0,41 e $p < 0,001$
Valores de OR e p obtidos	N.A	N.A	$p < 0,001$
Frequência do alelo/genótipo associado em pacientes	N.A	N.A	10,4 % e 45,8%
	Pinet et al. 1997	Ristori et al. 1997	Sang et al. 2005
Doença	Artrite reumatoide	Esclerose múltipla	Diabetes Tipo I
População	Caucasoides franceses	Italianos do norte	Chineses Han
Alelo e/ou genótipo associado	<i>DMA*01:03</i>	N.A	<i>DMA*01:03</i> e <i>DMA*01:02</i>
Tipo de associação encontrada	Susceptibilidade	Ausência de associação	Susceptibilidade e proteção OR= 8,05 e $p < 0,01$, OR= 0,21 e $p < 0,01$
Valores de OR e p obtidos	OR= 5,10 e $p < 0,05$	N.A	0,01
Frequência do alelo/genótipo associado em pacientes	13%	N.A	25% e 5,4%

NOTA: OR: "odds ratio"; p : valor de probabilidade; N.A: não aplicável

Ainda que o possível papel de *HLA-DMA* na patogênese do PF permaneça em análise, é válido mencionar que já há modelos propostos para explicar associações entre *HLA-DMA* e outras doenças autoimunes. Sang et al. (2005) propôs que determinados heterodímeros da molécula HLA-DM, codificados por certos alelos específicos de susceptibilidade de *HLA-DMA* ou *-DMB*, permitiriam o acoplamento do autoantígeno na fenda de moléculas MHC de classe II e a posterior apresentação dos complexos MHC:peptídeo na superfície de células apresentadoras. Caso estes alelos resultem em uma expressão reduzida de *DM*, pode-se levar em conta a hipótese proposta por Yi et al. (2010): tal redução de expressão permitiria também a peptídeos de menor afinidade se ligarem a moléculas HLA de classe II clássicas. Neste contexto, dada a maior competição entre peptídeos pela ligação a fenda de proteínas HLA clássicas, a probabilidade de um autoantígeno se ligar ao sulco destas moléculas seria menor. Ressalta-se, entretanto, que até o momento não se conhecem diferenças funcionais entre os diferentes alelos de *HLA-DMA* ou *-DMB*.

Se tomarmos como base o cenário mencionado anteriormente, seria de se esperar que alelos de baixa expressão de *DM* fossem fatores genéticos compartilhados entre doenças autoimunes, tendo um efeito protetor sobre a autoimunidade de maneira mais geral. Nesse caso, se a variante causadora da alteração funcional fosse compartilhada por diferentes grupos étnicos, a mesma associação seria observada em diferentes populações. No entanto, estudos de associação entre *HLA-DMA* e doenças autoimunes encontraram resultados discrepantes em diferentes populações humanas (PINET et al, 1997; YEN et al., 1997; YEN et al., 1999, MOREL et al., 2004).

Além da problemática associada ao tamanho amostral em estudos de alelos de baixa frequência, outras hipóteses podem também explicar estas discrepâncias e serão discutidas logo a seguir.

Variantes genéticas em regiões codificadoras podem estar em desequilíbrio de ligação com polimorfismos localizados em sequências não codificadoras, de modo que as associações encontradas com certos alelos possam ser o reflexo da presença de polimorfismos funcionais em regiões reguladoras. Sabe-se que o grau de desequilíbrio de ligação entre variantes genéticas varia de uma população para outra, como mencionado por Reich et al. (2001), o que poderia explicar o contraste de resultados nos estudos de associação entre *HLA-DMA* e doenças autoimunes.

No entanto, não constam na literatura estudos de associação entre *HLA-DMA* e patologias autoimunes que analisem outras variantes genéticas que não as localizadas em regiões codificadoras. Explorar o papel de polimorfismos regulatórios no contexto da autoimunidade pode ser relevante. Similarmente, em diferentes populações o grau de desequilíbrio de ligação entre alelos de *HLA-DMA* e variantes alélicas protetoras conhecidas, ou até mesmo ainda desconhecidas, de outros genes *HLA* próximos (a citar como exemplo *HLA-DR*, *-DQ* e *-DP*) também pode variar.

Outra hipótese capaz de explicar os resultados contrastantes no que diz respeito aos estudos de associação entre *HLA-DMA* e a autoimunidade tem um enfoque no fenômeno de interação gênica: o efeito de certos alelos de *DMA* poderia ser modificado pela presença de determinadas variantes genéticas em outros *loci* do genoma. A presença e frequência destas variantes também podem variar de um grupo étnico para outro.

Ressalta-se que, após o aumento da amostra, ainda que os diferentes alelos ou genótipos de *HLA-DMA* possam não conferir susceptibilidade diferencial ao PF, não se descarta a possibilidade de que variantes alélicas deste gene, por exemplo, possam se correlacionar com a sintomatologia da doença. Seria válido, se possível, inicialmente dividir os pacientes em dois subgrupos: os que já apresentaram a forma generalizada da doença e aqueles que nunca a tiveram. Posteriormente, seria necessário verificar se as frequências dos diferentes alelos e/ou genótipos de *HLA-DMA* diferem de maneira estatisticamente significativa entre estes dois subgrupos.

Similarmente, se após o aumento da amostra constatarmos que os diferentes alelos e/ou genótipos de *HLA-DMA* não conferem susceptibilidade diferencial ao PF, ainda há a possibilidade de que outras variantes localizadas em regiões reguladoras possam estar envolvidas na patogênese da doença. Tais variantes têm sido negligenciadas em estudos de associação com *HLA-DM* e seu possível papel na patogênese de doenças autoimunes ainda precisa ser elucidado.

Quanto ao estudo populacional, descrevemos a alta frequência do alelo *DMA*01:01:01* tanto na amostra de africanos quanto na de orientais. As frequências alélicas de *HLA-DMA* foram investigadas em amostras de indivíduos caucasóides do leste e oeste europeu, além de uma amostra de caucasóides norte-americanos. Para todas as amostras populacionais citadas anteriormente o alelo *DMA*01:01:01* também foi o mais frequente. Nestas mesmas amostras o alelo *DMA*01:03* ocorre com frequência reduzida (2,5% em média) (The Allele Frequency Net Database),

similarmente ao que observamos na amostra OR.

Recentemente Feng et al. (2012) analisaram o polimorfismo de *HLA-DMA* em uma amostra de Chineses Han. Estes autores ressaltam que os mesmos alelos encontrados em maior frequência em caucasóides europeus e norte-americanos (*DMA*01:01:01*) também foram os mais frequentes em Chineses Han, fato este que corrobora os achados anteriores de Jiang et al. (2008) ao também estudarem uma amostra populacional de chineses desta mesma etnia.

Embora *DMA*01:03* não esteja presente na amostra AF, não é possível excluir que este tenha surgido antes da expansão da espécie humana para fora do continente africano. Dados de outras populações africanas seriam úteis a fim de se elucidar este questionamento. A presença de *DMA*01:01:01* não amostra de africanos e sua ocorrência em várias outras populações mundiais, por sua vez, pode indicar que o aparecimento deste alelo é anterior a colonização de outros continentes por homínídeos, sendo dados da sequência de *-DMA* em primatas válidos para auxiliar o melhor entendimento da microevolução deste gene.

Por fim, no que diz respeito à descrição de novos alelos, não há dúvidas de que uma validação adicional é necessária. Portanto, nestes casos as reações de sequenciamento serão também realizadas na direção oposta. Destaca-se, contudo, que a variante 180C>T (rs150131046) já foi descrita pelo projeto 1000 Genomas, alcançando a sua frequência máxima (1%) em europeus. Similarmente, a substituição de uma timina por citosina no códon 154 de *HLA-DMA* (rs138600096) também já havia sido reportada pelo projeto 1000 Genomas. A frequência do alelo C neste caso é inferior a 1% nos diferentes grupos étnicos (Informação disponível em: < <http://browser.1000genomes.org/index.html>>).

Ao se empregar a metodologia de sequenciamento foi possível verificar que o *locus HLA-DMA* apresenta um alto grau de conservação, com poucos polimorfismos de nucleotídeo único em sequências codificadoras, o qual é condizente com a importância da conservação da estrutura de HLA-DM para sua função biológica.

7 CONCLUSÃO

Nas análises de associação entre *HLA-DMA* e o pênfigo foliáceo endêmico, não constatamos diferenças de frequências alélicas ou genóticas estatisticamente significativas entre o grupo de pacientes e controles. Após a reunião dos subgrupos de controles e pacientes euro-brasileiros e afro-brasileiros em uma única amostra, observou-se que a diferença entre pacientes e controles encontra-se próxima ao limiar de significância para o alelo *DMA*01:03* (OR= 0,28, $p= 0,06$). Ainda que ao se realizar múltiplas comparações valores de p baixos sejam esperados, um aumento do tamanho amostral nos permitirá confirmar ou não a tendência à associação observada nesta análise preliminar. Quanto ao estudo populacional, o alelo *DMA*01:01:01* foi encontrado em altas frequências tanto em AF quanto em OR, indicando a prevalência de uma única proteína de *-DMA* nos indivíduos pertencentes a estas amostras. *HLA-DMA* possui, portanto, um alto grau de conservação tanto em nível de sequência quanto de proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 1998, 469p.

ABREU-VELEZ, A. M.; I. J. REASON; M. S. HOWARD; A. M. ROSELINO. Endemic pemphigus foliaceus over a century: Part I. **N Am J Med Sci**. v. 2, n. 2, p. 51-59, 2010.

ABREU-VELEZ, A. M.; T. HASHIMOTO; W. B. BOLLAG; S. TOBON ARROYAVE; C. E. ABREU-VELEZ; M. L. LONDONO; F. MONTOYA; E. H. BEUTNER. A unique form of endemic pemphigus in northern Colombia. **J Am Acad Dermatol**. v. 49, n. 4, p. 599-608, 2003.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; ROBERTS, K; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed., Porto Alegre, Artmed, 2004.

ARDLIE, K. G.; L. KRUGLYAK; M. SEIELSTAD. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nat Rev Genet**. v. 3, n. 4, p. 299-309, 2002.

ARTEAGA, L. A.; P. S. PRISAYANH; S. J. WARREN; Z. LIU; L. A. DIAZ; M. S. LIN. A subset of pemphigus foliaceus patients exhibits pathogenic autoantibodies against both desmoglein-1 and desmoglein-3. **J Invest Dermatol**. v. 118, n. 5, p. 806-811, 2002.

AUGUSTO, D. G.; S. C. LOBO-ALVES; M. F. MELO; N. F. PEREIRA; M. L. PETZLER-ERLER. Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. **PLoS One**. v. 7, n. 7, p. e39991, 2012.

CARLSON, C. S.; T. C. MATISE; K. E. NORTH; C. A. HAIMAN; M. D. FESINMEYER; S. BUYSKE; F. R. SCHUMACHER; U. PETERS; N. FRANCESCHINI; M. D. RITCHIE; D. J. DUGGAN; K. L. SPENCER; L. DUMITRESCU; C. B. EATON; F. THOMAS; A. YOUNG; C. CARTY; G. HEISS; L. LE MARCHAND; D. C. CRAWFORD; L. A. HINDORFF; C. L. KOOPERBERG.

Generalization and dilution of association results from European GWAS in populations of non-European ancestry: the PAGE study. **PLoS Biol.** v. 11, n. 9, p. e1001661, 2013.

CARRINGTON, M.; A. HARDING. Sequence analysis of two novel HLA-DMA alleles. **Immunogenetics.** v. 40, n. 2, p. 165, 1994.

CHIOSSI, M. P.; A. M. ROSELINO. Endemic Pemphigus foliaceus ("Fogo selvagem"): a series from the Northeastern region of the State of Sao Paulo, Brazil, 1973-1998. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 43, n. 2, p. 59-62, 2001.

CROSBY, D.L; DIAZ, L.A. Endemic pemphigus foliaceus. Fogo Selvagem, **Dermatol Clin.** v. 11, n.13, p. 453- 462, 1993.

DALLA-COSTA, R.; M. R. PINCERATI; M. H. BELTRAME; D. MALHEIROS; M. L. PETZL-ERLER. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Hum Immunol.** v. 71, n. 8, p. 809-817, 2010.

DE BOER, R. J.; J. A. BORGHANS; M. VAN BOVEN; C. KESMIR; F. J. WEISSING. Heterozygote advantage fails to explain the high degree of polymorphism of the MHC. **Immunogenetics.** v. 55, n. 11, p. 725-731, 2004.

DEAKIN, J. E.; A. T. PAPENFUSS; K. BELOV; J. G. CROSS; P. COGGILL; S. PALMER; S. SIMS; T. P. SPEED; S. BECK; J. A. GRAVES. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region. **BMC Genomics.** v. 7, n. p. 281, 2006.

DELARBRE, C.; C. JAULIN; P. KOURILSKY; G. GACHELIN. Evolution of the major histocompatibility complex: a hundred-fold amplification of MHC class I genes in the African pigmy mouse *Nannomys setulosus*. **Immunogenetics.** v. 37, n. 1, p. 29-38, 1992.

DENZIN, L. K.; P. CRESSWELL. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. **Cell**. v. 82, n. 1, p. 155-165, 1995.

DICK, D. M.; T. FOROUD; H. J. EDENBERG; M. MILLER; E. BOWMAN; N. L. RAU; J. R. DEPAULO; M. MCINNIS; E. GERSHON; F. MCMAHON; J. P. RICE; L. J. BIERUT; T. REICH; J. NURNBERGER, JR. Apparent replication of suggestive linkage on chromosome 16 in the NIMH genetics initiative bipolar pedigrees. **Am J Med Genet**. v. 114, n. 4, p. 407-412, 2002.

EXCOFFIER, L.G; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinformatics**, p. 47-50.

FALLANG, L. E.; S. ROH; A. HOLM; E. BERGSENG; T. YOON; B. FLECKENSTEIN; A. BANDYOPADHYAY; E. D. MELLINS; L. M. SOLLID. Complexes of two cohorts of CLIP peptides and HLA-DQ2 of the autoimmune DR3-DQ2 haplotype are poor substrates for HLA-DM. **J Immunol**. v. 181, n. 8, p. 5451-5461, 2008.

GREER, J.P; FOERSTER, J; RODGERS, J.M; PARASKEVAS, F; GLADER, B; ARBER, D.A; MEANS, R.T. **Wintrobe's clinical hematology**.12 ed., vol 1, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

GUCE, A. I.; S. E. MORTIMER; T. YOON; C. A. PAINTER; W. JIANG; E. D. MELLINS; L. J. STERN. HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism. **Nat Struct Mol Biol**. v. 20, n. 1, p. 90-98, 2013.

GUO, S. W.; E. A. THOMPSON. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**. v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

ILMONEN, P.; D. J. PENN; K. DAMJANOVICH; L. MORRISON; L. GHOTBI; W. K. POTTS. Major histocompatibility complex heterozygosity reduces fitness in experimentally infected mice. **Genetics**. v. 176, n. 4, p. 2501-2508, 2007.

HANSEN, J.A. **Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop**, v. 1, 2006.

IMGT/HLA DATABASE. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>>. Acesso em: 02.05.2014.

KALLEL SELLAMI, M.; M. BEN AYED; H. MOUQUET; L. DROUOT; M. ZITOUNI; M. MOKNI; M. CERRUTI; H. TURKI; B. FEZZA; I. MOKHTAR; A. BEN OSMAN; A. ZAHAF; M. R. KAMOUN; P. JOLY; H. MASMOUDI; S. MAKNI; F. TRON; D. GILBERT. Anti-desmoglein 1 antibodies in Tunisian healthy subjects: arguments for the role of environmental factors in the occurrence of Tunisian pemphigus foliaceus. **Clin Exp Immunol**. v. 137, n. 1, p. 195-200, 2004.

KASAHARA, M.; M. F. FLAJNIK; T. ISHIBASHI; T. NATORI. Evolution of the major histocompatibility complex: a current overview. **Transpl Immunol**. v. 3, n. 1, p. 1-20, 1995.

KROPSHOFER, H.; S. O. ARNDT; G. MOLDENHAUER; G. J. HAMMERLING; A. B. VOGT. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. **Immunity**. v. 6, n. 3, p. 293-302, 1997.

KULSKI, J. K.; T. SHIINA; T. ANZAI; S. KOHARA; H. INOKO. Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. **Immunol Rev**. v. 190, n. p. 95-122, 2002.

LAHIRI, D. K., NURNBERGER, J. I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.

LI, N.; V. AOKI; G. HANS-FILHO; E. A. RIVITTI; L. A. DIAZ. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Exp Med**. v. 197, n. 11, p. 1501-1510, 2003.

MAENAKA, K.; E. Y. JONES. MHC superfamily structure and the immune system. **Curr Opin Struct Biol.** v. 9, n. 6, p. 745-753, 1999.

MedCalculator. Disponível em: <<http://www.medcalc.org>>. Acesso em: 24.05.14

MELLINS, E. D.; L. J. STERN. HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. **Curr Opin Immunol.** v. 26, n. p. 115-122, 2014.

MILNER, C. M.; R. D. CAMPBELL. Genetic organization of the human MHC class III region. **Front Biosci.** v. 6, n. p. D914-926, 2001.

MOREL, J.; F. ROCH-BRAS; N. MOLINARI; J. SANY; J. F. ELIAOU; B. COMBE. HLA-DMA*0103 and HLA-DMB*0104 alleles as novel prognostic factors in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** v. 63, n. 12, p. 1581-1586, 2004.

MORGAN, M. A.; P. S. MULLER; A. MOULD; S. A. NEWLAND; J. NICHOLS; E. J. ROBERTSON; A. COOKE; E. K. BIKOFF. The nonconventional MHC class II molecule DM governs diabetes susceptibility in NOD mice. **PLoS One.** v. 8, n. 2, p. e56738, 2013.

MOXLEY, G.; J. HAN. HLA DMA and DMB show no association with rheumatoid arthritis in US Caucasians. **Eur J Immunogenet.** v. 28, n. 5, p. 539-543, 2001.

NCBI- Entrez Gene. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> >. Acesso em: 08.05.2014.

OLIGO ANALYZER 3.0. Integrated DNA Technologies. Disponível em <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>>. Acesso em: 05.02.2014.

PASHINE, A.; R. BUSCH; M. P. BELMARES; J. N. MUNNING; R. C. DOEBELE; M. BUCKINGHAM; G. P. NOLAN; E. D. MELLINS. Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides. **Immunity.** v. 19, n. 2, p. 183-192, 2003.

PAVONI, D. P.; V. M. ROXO; A. MARQUART FILHO; M. L. PETZL-ERLER. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes Immun.** v. 4, n. 2, p. 110-116, 2003.

PENN, D. J.; K. DAMJANOVICH; W. K. POTTS. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 99, n. 17, p. 11260-11264, 2002.

PETZL-ERLER, M. L.; J. SANTAMARIA. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens.** v. 33, n. 3, p. 408-414, 1989.

PINET, V.; B. COMBE; O. AVINENS; S. CAILLAT-ZUCMAN; J. SANY; J. CLOT; J. F. ELIAOU. Polymorphism of the HLA-DMA and DMB genes in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** v. 40, n. 5, p. 854-858, 1997.

POS, W.; D. K. SETHI; K. W. WUCHERPFENNIG. Mechanisms of peptide repertoire selection by HLA-DM. **Trends Immunol.** v. 34, n. 10, p. 495-501, 2013.

POS, W.; D. K. SETHI; M. J. CALL; M. S. SCHULZE; A. K. ANDERS; J. PYRDOL; K. W. WUCHERPFENNIG. Crystal structure of the HLA-DM-HLA-DR1 complex defines mechanisms for rapid peptide selection. **Cell.** v. 151, n. 7, p. 1557-1568, 2012.

Primer3Plus. Fonte: <<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>> .Acesso em 02.02.2014.

PRIMER-BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>. Acesso em: 05.02.2014

PYO, C. W.; S. S. HUR; Y. K. KIM; T. Y. KIM; T. G. KIM. Association of TAP and HLA-DM genes with psoriasis in Koreans. **J Invest Dermatol.** v. 120, n. 4, p. 616-622, 2003.

RAMACHANDRA, L.; S. KOVATS; S. EASTMAN; A. Y. RUDENSKY. Variation in HLA-DM expression influences conversion of MHC class II alpha beta:class II-associated invariant chain peptide complexes to mature peptide-bound class II alpha beta dimers in a normal B cell line. **J Immunol.** v. 156, n. 6, p. 2196 - 2204, 1996.

REICH, D. E.; M. CARGILL; S. BOLK; J. IRELAND; P. C. SABETI; D. J. RICHTER; T. LAVERY; R. KOUYOUJIAN; S. F. FARHADIAN; R. WARD; E. S. LANDER. Linkage disequilibrium in the human genome. **Nature.** v. 411, n. 6834, p. 199-204, 2001.

REITH, W.; S. LEIBUNDGUT-LANDMANN; J. M. WALDBURGER. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. **Nat Rev Immunol.** v. 5, n. 10, p. 793-806, 2005.

RIESE, R. J.; P. R. WOLF; D. BROMME; L. R. NATKIN; J. A. VILLADANGOS; H. L. PLOEGH; H. A. CHAPMAN. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. **Immunity.** v. 4, n. 4, p. 357-366, 1996.

RISTORI, G.; C. CARCASSI; S. LAI; P. FIORI; A. CACCIANI; L. FLORIS; C. MONTESPERELLI; S. DI GIOVANNI; C. BUTTINELLI; L. CONTU; C. POZZILLI; M. SALVETTI. HLA-DM polymorphisms do not associate with multiple sclerosis: an association study with analysis of myelin basic protein T cell specificity. **J Neuroimmunol.** v. 77, n. 2, p. 181-184, 1997.

RODGERS, J. R.; R. G. COOK. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 5, n. 6, p. 459-471, 2005.

SABATINO, J. J., JR.; J. HUANG; C. ZHU; B. D. EVAVOLD. High prevalence of low affinity peptide-MHC II tetramer-negative effectors during polyclonal CD4+ T cell responses. **J Exp Med.** v. 208, n. 1, p. 81-90, 2011.

SANDERSON, F.; S. H. POWIS; A. P. KELLY; J. TROWSDALE. Limited polymorphism in HLA-DM does not involve the peptide binding groove. **Immunogenetics**. v. 39, n. 1, p. 56-58, 1994.

SANG, Y.M; YAN, C; ZHU, C; NI, G.C; HU, Y.M Relationship between HLA-DMA, -DMB alleles and Type I Diabetes in Chinese. **HK J Paediatr**. v. 10, p. 20-25, 2005.

SHERMAN, M. A.; D. A. WEBER; E. A. SPOTTS; J. C. MOORE; P. E. JENSEN. Inefficient peptide binding by cell-surface class II MHC molecules. **Cell Immunol**. v. 182, n. 1, p. 1-11, 1997.

SIEGMUND, T.; H. DONNER; J. BRAUN; K. H. USADEL; K. BADENHOOP. HLA-DMA and HLA-DMB alleles in German patients with type 1 diabetes mellitus. **Tissue Antigens**. v. 54, n. 3, p. 291-294, 1999.

STANLEY, J. R.; L. KOULU; C. THIVOLET. Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. **J Clin Invest**. v. 74, n. 2, p. 313-320, 1984.

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

TROWSDALE, J.; J. C. KNIGHT. Major histocompatibility complex genomics and human disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet**. v. 14, n. p. 301-323, 2013.

WARREN, S. J.; M. S. LIN; G. J. GIUDICE; R. G. HOFFMANN; G. HANS-FILHO; V. AOKI; E. A. RIVITTI; V. SANTOS; L. A. DIAZ. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **N Engl J Med**. v. 343, n. 1, p. 23-30, 2000.

WILKENING, S.; B. CHEN; J. L. BERMEJO; F. CANZIAN. Is there still a need for candidate gene approaches in the era of genome-wide association studies? **Genomics**. v. 93, n. 5, p. 415-419, 2009.

XIE, T.; L. ROWEN; B. AGUADO; M. E. AHEARN; A. MADAN; S. QIN; R. D. CAMPBELL; L. HOOD. Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex

class III region and its comparison to mouse. **Genome Res.** v. 13, n. 12, p. 2621-2636, 2003.

YEN, J. H.; C. J. CHEN; W. C. TSAI; J. J. TSAI; J. G. CHANG; H. W. LIU. HLA-DMA and DMB genotyping in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.** v. 24, n. 3, p. 442-444, 1997.

YEN, J. H.; C. J. CHEN; W. C. TSAI; J. J. TSAI; T. T. OU; H. W. LIU. HLA-DMA and HLA-DMB genotyping in patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol.** v. 26, n. 9, p. 1930-1933, 1999.

YI, W.; N. P. SETH; T. MARTILLOTTI; K. W. WUCHERPFENNIG; D. B. SANT'ANGELO; L. K. DENZIN. Targeted regulation of self-peptide presentation prevents type I diabetes in mice without disrupting general immunocompetence. **J Clin Invest.** v. 120, n. 4, p. 1324-1336, 2010.