

KARIN BRAUN-PRADO

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES
IL4, *IL13* E *PDCD1* E INVESTIGAÇÃO DE
POSSÍVEIS INTERAÇÕES GÊNICAS NO
PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-
Graduação em Genética, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler

CURITIBA

2006

O Homem só envelhece quando os lamentos substituem seus sonhos.

Provérbio Chinês

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, pela dedicação e competência com que orienta seus alunos. Um exemplo a ser seguido.

Às professoras Dras. Eleidi Alice Chautard Freire-Maia e Enilze Maria Ribeiro, pela leitura crítica e pelas sugestões relevantes que contribuíram para a finalização deste trabalho.

À Dra. Noemi Farah Pereira, pela sua inestimável ajuda e criteriosa avaliação deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana: à Marcinha, pelas “injeções de ânimo” na fase final desta tese; à Danielle, pelo apoio nas horas mais difíceis; à Karen, pela sua solicitude; ao Rodrigo, pelas horas de divagação científica e das boas gargalhadas pertinentes; ao Danillo e Letícia, pelas horas disputadas na máquina de PCR e pelas brincadeiras daí decorrentes; à Rafaela, pelo auxílio na digitação dos dados para análise estatística - Santa Rafa; à Liana, pela análise crítica do meu trabalho; à Márcia, pela tranquilidade, enfim a todos os amigos do Laboratório, pelo companheirismo e alegria, que tornavam o ambiente de trabalho muito mais agradável.

À Ana Lúcia Vieira Mion, Márcia Quiroga e Marcelo Mion, amigos que sempre me ajudaram nos momentos técnicos mais críticos.

À toda competente equipe do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas, coordenado pela Dra. Noemi Farah Pereira, pela disponibilização dos materiais e dos equipamentos que me auxiliaram na conclusão deste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora desta tese, Professora Dra. Sídia Callegari-Jacques, Professora Dra. Luiza Guilherme, Professora Dra. Ilíada Rainha de Souza, Professora Dra. Nina Pagnan, Professor Dr. Iglénir João Cavalli, pela análise deste trabalho e sugestões relevantes que contribuíram para a melhoria desta tese.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Genética, que propiciaram a minha formação e me apoiaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Alfredo Marquardt Filho, do Hospital Adventista do Pênfigo, em Campo Grande, MS, por viabilizar as coletas de sangue dos pacientes com pênfigo.

Ao Dr. Cláudio Madruga, da EMBRAPA-Gado de Corte, Campo Grande, MS, por disponibilizar seu laboratório para realização do congelamento de leucócitos.

Aos órgãos de suporte financeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) e Fundação Araucária, que viabilizaram a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial a todos os membros da minha família, que me auxiliaram na concretização deste trabalho através do seu apoio e estímulo.

Aos meus pais, Heinz Braun e Olívia Pazinato Braun, pelo apoio incondicional.

À minha filha, Carolina Braun Prado, por tornar a minha vida colorida.

Ao meu marido, Paulo Henrique Müller Prado, pela ajuda ímpar na compreensão da análise de regressão logística, pela estabilidade emocional necessária para a execução deste trabalho e, sobretudo, pelo companheirismo, carinho e amor a mim dedicados.

À quem está sempre iluminando a minha trajetória de vida, por me dar força e confiança.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. Introdução.....	1
2.Revisão Bibliográfica	3
2.1. Pênfigo Foliáceo - aspectos gerais e epidemiológicos	3
2.2 Auto-imunidade.....	5
2.3 Pênfigo foliáceo como doença auto-imune	8
2.3.1 Pênfigo Foliáceo - aspectos imunológicos	8
2.3.2 Pênfigo Foliáceo - aspectos genéticos.....	11
2.4. Citocinas.....	14
2.4.1. Citocinas e Linfócitos.....	14
2.4.2. As citocinas IL-13 e IL-4 e suas relações com doenças complexas.....	16
2.5. Auto-imunidade e receptor de morte programada PD-1	20
2.6 Genes <i>IL4</i> , <i>IL13</i> e <i>PDCD1</i>	22
2.6.1 Estrutura e variabilidade dos genes <i>IL4</i> e <i>IL13</i>	22
2.6.2. Estrutura e variabilidade do gene <i>PDCD1</i>	27
3. Justificativas e Objetivos.....	30
4. Materiais e Métodos	32
4.1 Caracterização das amostras.....	32
4.2 Extração do DNA genômico	34
4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	34
4.4 Tipificação das variantes dos genes <i>HLA-DRB1</i> , <i>HLA-DQB1</i> , <i>HLA-DQA1</i> , <i>IL13</i> e <i>PDCD1</i> pelo método PCR-SSOP (Polimerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probes).....	36
4.4.1 Marcação das sondas de <i>IL13</i> e <i>PDCD1</i> com digoxigenina	37
4.4.2 Marcação das sondas <i>HLA-DRB1</i> , <i>HLA-DQA1</i> , <i>HLA-DQB1</i> com biotina	37
4.4.3 Confeção de <i>dot-blots</i> para tipificação de <i>HLA-DRB1</i> , <i>HLA-DQA1</i> , <i>HLA-DQB1</i> , <i>PDCD1 +7785</i> e <i>PDCD1 +8737</i> por PCR-SSOP	38
4.4.4 Hibridação dos produtos de PCR dos genes <i>HLA-DRB1</i> , <i>HLA-DQA1</i> e <i>HLA-DQB1</i> com sondas marcadas com biotina	38
4.4.5 Hibridação dos produtos de PCR dos genes <i>PDCD1 +7785</i> e <i>PDCD1 +8737</i> com sondas marcadas com digoxigenina	39
4.4.6 Desibridação	40
4.5. Tipificação de SNPs pelo método da PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism)	40
4.6 Tipificação da repetição em tandem de número variável de <i>IL4</i>	42
4.7 Tipificação do microssatélite do gene <i>PDCD1</i>	43
4.7.1 Preparo das amostras para eletroforese em gel desnaturante	44
4.7.2 Eletroforese em gel desnaturante.....	44
4.7.3 Análise e interpretação dos dados	44
4.8 Análise Estatística	44

5. Resultados.....	49
5.1. Análise do gene <i>IL13</i>	49
5.2. Análise do gene <i>IL4</i> e dos haplótipos dos genes <i>IL4</i> e <i>IL13</i>	56
5.3. Análise do gene <i>PDCD1</i>	64
5.3.1 Análise do microssatélite de <i>PDCD1</i>	71
5.4. Análise do gene <i>HLA-DRB1</i>	71
5.5 Análise de interação entre os genes <i>HLA-DRB1</i> , <i>PDCD1</i> , <i>IL13</i> , <i>DSG1</i> , <i>IL4</i> , <i>IL6</i> e <i>IL4R</i> no que se refere à susceptibilidade ao PF (Pênfigo foliáceo).....	72
6. Discussão.....	83
6.1 Considerações gerais	83
6.2 Gene <i>IL13</i>	84
6.3 Gene <i>IL4</i>	87
6.4 Haplótipos de <i>IL13</i> e <i>IL4</i>	88
6.5 Gene <i>PDCD1</i>	89
6.6 Interação gênica.....	93
6.7 Mecanismos subjacentes às associações	96
7. Conclusões.....	99
8. Referências Bibliográficas.....	100
8. Anexos:.....	115
8.1 Ficha de averiguação	115

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	LESÕES CARACTERÍSTICAS DO PF.....	3
FIGURA 2:	INTERAÇÃO <i>HLA-DRB1</i> E <i>IL4-590</i>	96
FIGURA 3:	INTERAÇÃO <i>HLA-DRB1</i> E PD1.3.....	97
FIGURA 4:	INTERAÇÃO PD1.3 E <i>IL4</i>	97
FIGURA 5:	INTERAÇÃO PD1.3 E <i>IL4</i> E DOENÇA.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Protocolo para amplificação das regiões polimórficas dos genes <i>IL13</i> e <i>PDCDI</i>	36
TABELA 2. Seqüências dos oligonucleotídeos-iniciadores e sondas empregados para tipificação dos SNPs <i>IL13</i> -591, <i>IL13</i> +2525, <i>PDCDI</i> +7785 e <i>PDCDI</i> +8737 identificadas pelo método PCR-SSOP	37
TABELA 3. Oligonucleotídeos-iniciadores usados na amplificação de regiões polimórficas dos genes das interleucinas e dos receptores para análise por PCR-RFLP	41
TABELA 4. Endonucleases de restrição e fragmentos gerados após digestão dos produtos da PCR dos genes <i>IL13</i> , <i>IL13RA1</i> e <i>PDCDI</i>	42
TABELA 5. Codificação dos fenótipos do gene <i>HLA-DRB1</i> para análise de regressão logística	47
TABELA 6. Comparação das freqüências (%) alélicas, genotípicas e de portadores do SNP <i>IL13</i> -1111(C,T) entre pacientes com PF e controles	51
TABELA 7. Comparação das freqüências (%) alélicas, genotípicas e de portadores do SNP <i>IL13</i> +2044(G,A) entre pacientes com PF e controles	52
TABELA 8. Comparação das freqüências (%) alélicas, genotípicas e de portadores das variantes do SNP <i>IL13</i> +2525(G,A) entre pacientes com PF e controles	53
TABELA 9. Comparação das freqüências haplotípicas (%) do gene <i>IL13</i> entre pacientes com PF e controles	54
TABELA 10. Valores de desequilíbrio de ligação (Δ') entre os SNPs do gene <i>IL13</i> nas subamostras de EU e AF de pacientes e controles	55
TABELA 11. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às freqüências (%) alélicas, genotípicas, haplotípicas e de portadores das variantes do polimorfismo <i>IL4 VNTR</i> (1,2,3,4) e do haplótipo <i>IL4</i> -590 (C,T) e <i>VNTR</i> (1,2,3,4)	58

TABELA 12. Valores de desequilíbrio de ligação (Δ') entre as duas posições variáveis do gene <i>IL4</i> : SNP -590 (C, T) e o VNTR (1,2,3,4)	59
TABELA 13. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências haplotípicas (%) para as posições <i>IL4VNTR</i> e <i>IL13+2044</i> , <i>IL4VNTR</i> e <i>IL13 -1111</i> e para <i>IL4VNTR</i> e <i>IL13 +2525</i>	61
TABELA 14. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências haplotípicas (%) para as posições <i>IL4 -590</i> e <i>IL13+2044</i> , <i>IL4 -590</i> e <i>IL13 -1111</i> e para <i>IL4 -590</i> e <i>IL13 +2525</i>	62
TABELA 15. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências haplotípicas (%) dos genes <i>IL4</i> e <i>IL13</i>	63
TABELA 16. Comparação das frequências (%) alélicas, genóticas e de portadores das variantes do SNP <i>PDCDI+7146(G,A)</i> , ou PD1.3 entre pacientes com PF e controles	65
TABELA 17. Comparação das frequências (%) alélicas, genóticas e de portadores das variantes do SNP <i>PDCDI +7785(C,T)</i> ou PD1.5 entre pacientes com PF e controles	67
TABELA 18. Comparação das frequências (%) alélicas, genóticas e de portadores das variantes do SNP <i>PDCDI +8737(G,A)</i> ou PD1.6 entre pacientes com PF e controles	68
TABELA 19. Valores de desequilíbrio de ligação (Δ') entre os SNPs do gene <i>PDCDI</i> nas subamostras de EU e AF de pacientes e controles	69
TABELA 20. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências haplotípicas (%) do gene <i>PDCDI</i>	70
TABELA 21. Comparação das frequências alélicas do microssatélite <i>PDCDI +8151</i> entre os quatro grupos étnicos	71
TABELA 22. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências fenotípicas (%) do gene <i>HLA-DRB1</i>	72
TABELA 23. Codificação dos genótipos dos genes <i>IL13</i> , <i>PDCDI</i> , <i>DSG1</i> , <i>IL4</i> , <i>IL6</i> e <i>IL4R</i> para análise de regressão logística	73
TABELA 24. Resultados de cinco análises de regressão logística considerando cada gene individualmente	74

TABELA 25. Modelo final de regressão logística para pacientes com PF e controles	75
TABELA 26. Análise de interação entre os SNPs PD1.3 e <i>IL4</i> -590	76
TABELA 27. Análise de interação entre os genes <i>HLA-DRB1</i> e PD1.3	78
TABELA 28. Análise de interação entre os genes <i>HLA-DRB1</i> e <i>IL4</i> -590	80
TABELA 29. Análise de interação entre os SNPs dos genes <i>IL4R</i> e <i>IL4</i> -590	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Afro-brasileiro
AP-1	Proteína de ativação 1
AR	Artrite reumatóide
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
C3	Proteína do 3º componente do sistema complemento
CAA	Célula apresentadora de antígeno
CAM	Molécula de adesão celular
CTLA-4	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
DA	Doença de Alzheimer
Dsg1	Desmogleína 1
Dsg3	Desmogleína 3
EC	Ectodomínio
EU	Euro-brasileiro
Fab	Fração ligadora do antígeno
FR	Febre reumática
FS	Fogo selvagem
IFN γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
JAK	Quinases de tirosina da família Janus
kDa	Kilo daltons
LES	Lupus eritematoso sistêmico
LTA	Linfotoxina alfa
Mb	Mega bases
MAP	Proteína quinase mitógeno ativada
MBP	Proteína mielínica básica
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

NFAT	Fator nuclear de linfócitos T ativados
NOD	<i>Nonobese diabetic</i>
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PF	Pênfigo foliáceo
PV	Pênfigo vulgar
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RUNX1	<i>Runt Related Transcription Factor 1</i>
SHP-2	<i>SH-2 Domain-Containing Phosphatases</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSOP	<i>Sequence Specific Oligonucleotide Probe</i>
TCR	Receptor de célula T
Th	<i>T helper</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VNTR	Número variável de repetições em tandem
ZAP-70	Proteína zeta associada 70

RESUMO

Pênfigo foliáceo (PF) é uma doença auto-imune da epiderme, caracterizada pela produção de auto-anticorpos contra uma molécula de adesão celular, a desmogleína-1, expressa nos queratinócitos. Essa doença, que é endêmica no Brasil, é multifatorial. Portanto, as diferenças interindividuais de susceptibilidade são devidas a variantes de vários genes, mas a presença de qualquer uma destas não é suficiente nem necessária para que a doença ocorra. A interação entre estes poligenes pode acentuar ou atenuar a susceptibilidade à doença. Determinadas variantes dos genes *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* e *HLA-DQB1* foram associadas ao PF. Associações positivas do PF com o genótipo T/T de *IL4 -590* e com a presença do alelo *IL6 -174G* (genótipos G/G e G/C) também foram descritas. Um efeito protetor do genótipo C/C de *IL6 -174* foi sugerido, enquanto nenhuma associação foi encontrada com variantes dos genes das citocinas *IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL4R* e *IL10* ou com o gene do autoantígeno, *DSG1*. Os objetivos deste estudo foram identificar outros fatores genéticos na patogênese do PF. Genes cujos produtos estão relacionados com a regulação da resposta imune, tal qual o *PDCD1*, bem como a IL-4 e a IL-13, as principais citocinas do perfil Th2, foram investigados. Os polimorfismos +7146 (PD1.3), *PDCD1* + 7785 (PD1.5) e +8737 (PD1.6) do gene *PDCD1*; -1111, +2044 e +2525 *IL13* do gene *IL13*, além do VNTR de *IL4*, foram estudados. A influência das interações entre os genótipos destes genes, bem como daqueles cujas variantes polimórficas foram previamente associadas ao PF, foi analisada. A amostra é composta por 160 pacientes e 340 controles e é constituída por euro-brasileiros (EU) e afro-brasileiros (AF). A abordagem foi um estudo de associação caso-controle empregando os métodos de PCR-RFLP e PCR-SSOP para determinar os genótipos individuais. Nenhuma associação foi observada entre o PF e as variantes alélicas de *IL13 -1111*, +2044, +2525 e de *PDCD1* + 7785 (PD1.5). Na subamostra EU, houve associações positivas com o alelo PD1.6A (OR = 1,76), o genótipo A/G de PD1.6 (OR = 2,05), o alelo 2 (OR = 2,15) e os genótipos 2/2 (OR = 5,20) e 1/2 (OR = 2,11) do VNTR de *IL4*, assim como com os haplótipos *IL4-590T_VNTR2* e *IL4-590T_VNTR1* (OR = 2,40 e 1,89 respectivamente). Também foram encontradas, em EU, associações negativas com o alelo VNTR 1 (OR = 0,47), o haplótipo *IL4 -590C_VNTR1* (OR = 0,44) e o alelo G de PD1.6 (OR = 0,57). Na subamostra de AF, o alelo 1 do VNTR de *IL4* estava associado negativamente com o PF (OR = 0,34). Foi observada uma tendência de associação negativa entre o alelo A de PD1.3 e o PF (OR = 0,59, $P < 0,07$); além disso, a interação entre o genótipo PD1.3G/A e o *IL4-590 C/T* (OR = 0,15) sugere um efeito protetor contra o PF. Entretanto, a presença concomitante dos genótipos PD1.3 G/G e *IL4-590 T/T* confere suscetibilidade ao PF (OR = 2,55). Interações entre PD1.3 e *DRB1* mostram que portadores do alelo PD1.3 A estão protegidos do PF mesmo na presença de fenótipos *DRB1* de suscetibilidade (OR = 0,24); este resultado sugere um efeito epistático de PD1.3 sobre *DRB1*. Foi também encontrado um efeito aditivo entre os genes *DRB1* e *IL4*: a suscetibilidade conferida pelo genótipo T/T de *IL4-590* é mais elevada na presença de um fenótipo *DRB1* suscetível (OR = 7,91), intermediária com fenótipo *DRB1* neutro (OR = 3,16), e mais baixa com fenótipo *DRB1* protetor (OR = 1,62). Os fenótipos *HLA-DRB1* contribuem com 31,0% para a manifestação da doença enquanto os genótipos de *IL4 -590* o fazem com 2,1%. Não houve evidência de interação entre PD1.3 e *IL6 -174* nem entre *IL4R* e *IL4-590*.

ABSTRACT

Pemphigus foliaceus (PF) is an epidermal autoimmune disease, characterized by autoantibodies production against a cellular adhesion molecule, desmoglein1, expressed in keratinocytes. This disease, which is endemic in Brazil, is multifactorial. Therefore, interindividual differences in susceptibility are due to variants of several genes, but the presence of any of them is neither enough nor required for disease to occur. The interaction of these polygenes may either strengthen or attenuate the disease susceptibility. Certain variants of *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* and *HLA-DQB1* genes have been found associated with PF. Positive associations of PF with *IL4* -590 T/T genotype and with presence of *IL6* -174G (G/G and G/C) have also been described. A protective effect of *IL6*-174 C/C genotype has been suggested while no associations were found with either variants of the cytokine genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL4R* and *IL10* or the autoantigen gene *DSG1*. The aims of this study were to identify other genetic factors to PF pathogenesis. Genes whose products are related to immunoregulation like *PDCD1* as well as the *IL4* and *IL13*, the main cytokines of the Th2 profile, were investigated. Polymorphisms +7146 (PD1.3), +7785 (PD1.5) and +8737 (PD1.6) of *PDCD1* gene, -1111, +2044 and +2525 of *IL13* gene in addition to the *IL4* VNTR were studied. Influence of interactions among genotypes of these genes as well as of those whose polymorphic variants were previously found associated with PF were analyzed. The sample included 160 patients and 340 controls and was comprised of Euro-Brazilians (EU) and Afro-Brazilians (AF). The approach was an association study in a case-control design using PCR-RFLP and PCR-SSOP for individual genotyping. No association of PF was observed with variants of *IL13* -1111, +2044, +2525 and *PDCD1* +7785 (PD1.5). In the EU sample, there were positive associations with allele PD1.6A (OR=1.76), genotype PD1.6 A/G (OR=2.05), allele *IL4* VNTR 2 (OR=2.15), VNTR 2/2 genotype (OR=5.20) and VNTR 1/2 genotype (OR=2.11) as well as with haplotypes 590T_VNTR2 and *IL4*-590T_VNTR1 (OR=2.40 and 1.89, respectively). Negative associations with *IL4* VNTR 1 (OR=0.47), haplotype *IL4* -590C_VNTR1 (OR=0.44) and allele PD1.6G (OR=0.57) were also found in EU. In the AF sample, allele *IL4* VNTR 1 (OR=0.34) was negatively associated to PF. A trend of negative association with PD1.3 A (OR=0.59, $P<0.07$) was found; besides, the interaction between PD1.3 G/A and *IL4*-590 C/T genotypes (OR=0.15) suggests a protective effect from PF. However, the concomitant presence of PD1.3 G/G and *IL4*-590 T/T (OR=2.55) confers susceptibility to PF. Interactions between PD1.3 and *HLA-DRB1* show that bearers of PD1.3 A allele are protected from PF even in the presence of susceptible *DRB1* phenotypes (OR=0.24); this data suggests an epistatic effect of PD1.3 A on *DRB1*. It was also found an additive effect between *HLA-DRB1* and *IL4* genes: susceptibility conferred by the *IL4* -590 T/T genotype is high in the presence of a susceptible *HLA-DRB1* genotype (OR=7.91), intermediate in the neutral *HLA-DRB1* population stratum (OR=3.16), and low in the protective *HLA-DRB1* stratum (OR=1.62). *HLA-DRB1* phenotypes contribute with 31.0% to disease manifestation while *IL4* -590 genotypes do so with 2.1%. There were no evident interactions either between PD1.3 and *IL6* -174 or between *IL4R* and *IL4*-590.

1. Introdução

Os diversos fenótipos das doenças complexas são atribuídos à interação entre vários genes e fatores ambientais, por isso elas são também designadas de multifatoriais. Nestas doenças, a presença de um alelo não é condição suficiente nem essencial para o estabelecimento do fenótipo alterado. As doenças complexas, entre as quais se incluem as auto-imunes, desenvolvem-se a partir da combinação desse conjunto de fatores.

Doenças auto-imunes caracterizam-se pelo ataque do sistema imunológico a um ou mais órgãos próprios devido à desregulação da complexa rede da resposta imune. São doenças comuns que afetam 5% a 10% da população e incluem o diabetes do tipo 1, a artrite reumatóide (AR), o lupus eritematoso sistêmico (LES) e entre outras, o pênfigo foliáceo, objeto deste estudo.

O pênfigo foliáceo (PF) é endêmico no Brasil, onde também é conhecido como “fogo selvagem”. O PF caracteriza-se, assim como muitas doenças auto-imunes, pela presença de auto-anticorpos, que neste caso são direcionados contra a desmogleína 1, uma glicoproteína de adesão celular presente nos desmossomos da epiderme. Há formação de bolhas superficiais na pele, decorrentes da interação dos auto-anticorpos com o auto-antígeno.

A etiologia do pênfigo foliáceo é desconhecida. Estudos epidemiológicos sugerem que a forma endêmica do pênfigo foliáceo é desencadeada por um ou mais fatores ambientais que podem apresentar distribuição geográfica limitada. De forma semelhante à maioria das doenças auto-imunes, o PF é decorrente da ação conjunta de múltiplos genes cujos alelos podem estar presentes tanto em pessoas saudáveis como nas afetadas pela doença. Alguns destes alelos podem conferir susceptibilidade, e outros, proteção ao estabelecimento e/ou à modulação da doença, embora variantes alélicas de diferentes genes não tenham efeitos iguais ou equivalentes na etiologia do PF. A auto-imunidade patogênica é decorrente do modo como os produtos desses genes interagem entre si e com os fatores ambientais.

A presença da doença em indivíduos geneticamente relacionados e a sua ausência em indivíduos moradores nas áreas endêmicas são indícios do envolvimento de fatores genéticos na etiologia do PF endêmico. Considerando que esta doença resulta do desequilíbrio na resposta imune, há vários genes candidatos à predisposição ao PF, entre eles, os genes *HLA* (Antígenos Leucocitários Humanos).

Estudos de associação foram realizados entre os genes *HLA* de classe II e o PF e evidenciaram que suas variantes alélicas atuam modulando a susceptibilidade e a proteção ao

PF (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989; MORAES et al., 1991; PAVONI et al., 2003; ROXO, 2003).

No presente estudo, realizamos análises de associação caso-controle entre o PF e alguns genes candidatos. A escolha destes genes foi condicionada ao conhecimento da função de seus produtos bem como de seus polimorfismos. Escolhemos aqueles que codificam as citocinas IL-13 (IL = Interleucina) e IL-4 pelo fato de transcritos destas e de outras que constituem o perfil de resposta tipo Th2, ter sido encontrado tanto nas lesões epidérmicas quanto em clones de células TCD4+, específicos para a desmogleína-1, isolados de pacientes com PFE (LIN et al., 2000; CAPRONI et al., 2001). Além disso, estas moléculas imunomoduladoras atuam em diferentes fases da resposta imune específica e estão implicadas na patogênese de muitas doenças decorrentes de alterações na resposta imune. Variantes dos genes destas citocinas e de seus receptores já foram associadas com artrite juvenil, asma, rinite alérgica, atopia, níveis séricos de IgE.

O gene *PDCDI* codifica a molécula PD-1, responsável pela inibição da ativação dos linfócitos e, portanto, é um gene candidato para estudos de associação com uma doença como o PF, na qual ocorre uma resposta imune humoral exacerbada. Variantes deste gene estão associadas com lupus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla.

Este estudo faz parte de um projeto maior desenvolvido pelo Laboratório de Genética Molecular Humana da Universidade Federal do Paraná (LGMH-UFPR) que investiga genes de susceptibilidade ao PF. Os resultados deste estudo foram agregados ao conhecimento anterior obtido pelo grupo do LGMH para realização de uma análise de interação entre genes estudados previamente (*IL6*, *DSG1*, *HLA-DRB1* e *ILAR*) e os analisados neste estudo, no que se refere à susceptibilidade à doença pênfigo foliáceo. A análise conjunta de todos estes genes, a importância individual relativa destes polimorfismos na probabilidade de manifestação da doença e a análise das possíveis interações gênicas entre as suas variantes bem como, a influência destas interações na manifestação do PF, tornam este estudo pioneiro na tentativa de elucidar o complexo mecanismo auto-imune do pênfigo foliáceo.

2.Revisão Bibliográfica

2.1. Pênfigo Foliáceo - aspectos gerais e epidemiológicos

As doenças auto-ímmunes bolhosas são classificadas conforme o sítio estrutural onde ocorre deposição de componentes da resposta imune e também de acordo com o alvo molecular dos auto-anticorpos. Seguindo esta classificação há o grupo designado pênfigo, o grupo penfigóide, a epidermólise bolhosa adquirida e a dermatite herpetiforme (SITARU e ZILLIKENS, 2005).

O termo pênfigo refere-se a um grupo de doenças auto-ímmunes cutâneas ou mucocutâneas caracterizadas por bolhas intraepiteliais (ANHALT et al., 1990). Estas bolhas são causadas pela perda da adesão normal entre as células, um processo chamado acantólise, que consiste em uma desorganização molecular na estrutura dos desmossomos, com conseqüente perda de adesão entre os queratinócitos epidérmicos ou entre as células epiteliais das mucosas (DIAZ et al., 1989).

Há dois tipos principais de pênfigo, pênfigo vulgar (PV) e pênfigo foliáceo (PF) (figura 1).



FIGURA 1: LESÕES CARACTERÍSTICAS DO PF. FONTE: Hospital Adventista do Pênfigo, Campo Grande, MS.

Além destas duas formas há ainda o pênfigo mediado por IgA, que é caracterizado por vesículas de pústula nas lesões de pele, infiltração de neutrófilos na superfície celular e auto-anticorpos anti-queratinócitos da classe IgA (HASHIMOTO, 2001 apud SITARU e ZILLIKENS, 2005). Epidemiologicamente, o pênfigo foliáceo possui duas formas: o clássico, também conhecido por esporádico ou de Cazenave, que ocorre em diversas partes do mundo, e o endêmico, também conhecido como Fogo Selvagem (FS), cuja incidência é restrita a países da América do Sul e a certas regiões do Brasil (MINELLI, 1986; DIAZ et al., 1989). Os estados brasileiros com maior número de pacientes com PF endêmico são Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (DIAZ et al., 1989).

A forma endêmica do PF ocorre mais comumente em adultos jovens e crianças, tendo um pico de incidência entre a segunda e a terceira décadas de vida (DIAZ et al., 1989). PF endêmico afeta normalmente pessoas que vivem ou viveram em áreas rurais e mais raramente ocorre em indivíduos que não tiveram contato com este meio. Devido a sua endemicidade, suspeita-se que o PF seja desencadeado por um ou mais fatores ambientais. Um dos possíveis fatores de risco, cuja distribuição geográfica apresentou uma correlação positiva com a doença, foi a picada do inseto *Simulium nigrimanum* (borrachudo, mosca negra) (LOMBARDI et al., 1992; EATON et al., 1998). A distribuição desta espécie de inseto coincide com os focos da doença ou proximidades a estes, conforme descreve ARANHA-CAMPOS, 1942 (apud MINELLI 1986), em que muitos pacientes relataram residir próximos a rios ou riachos, que constituem habitat para insetos da família *Simuliidae*.

Há ainda outros fatores ambientais propostos como agentes desencadeadores de PF endêmico. Entre eles estão fatores nutricionais. TUR e BRENNER (1998) levantam a possibilidade de que alimentos que contenham fenol, como a manga, a mandioca, o guaraná e a castanha de caju, estejam contribuindo para a indução ou exacerbação do pênfigo. Alimentos e plantas que apresentam o grupo químico tiol, como o alho-poró, a cebola e o alho, podem também desencadear a doença. O pênfigo pode ser induzido pelo contato com pesticidas que apresentam o grupo fosfamida. Entretanto, não foi observado um aumento significativo no risco de desenvolver a doença entre indivíduos de áreas endêmicas expostos a estes agentes químicos (TUR e BRENNER, 1997).

2.2 Auto-imunidade

A auto-imunidade é uma condição na qual o organismo desenvolve uma resposta imune contra constituintes próprios. As doenças auto-imunes resultam da complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Clones de células B e T auto-reativos existem normalmente no organismo e a reatividade dos mesmos é controlada por mecanismos homeostáticos. Falhas nestes controles levam à ativação dos clones auto-reativos e ao desenvolvimento de doenças auto-imunes.

O principal mecanismo responsável pela ausência de reação imunológica contra antígenos próprios é a deleção clonal de células T auto-reativas em desenvolvimento, que ocorre no timo. Durante a indução da tolerância central são selecionadas aquelas células T, cujos receptores (TCR) reconhecem peptídeos associados às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) próprias. Sobrevivem à apoptose, ou morte programada, apenas as células T que interagem com moléculas MHC e que apresentam baixa afinidade para os peptídeos próprios presentes nos sulcos destas moléculas.

Além deste mecanismo de tolerância central, que permite a discriminação entre tecidos próprios e não próprios, existe a tolerância periférica. Esta tolerância é induzida naquelas células T capazes de reconhecer auto-antígenos que não estavam presentes na ontogenia das células T no timo ou, estavam presentes, mas em quantidades insuficientes (ARNOLD et al., 1997; KAMRADT e MITCHISON, 2001).

Após a saída dos linfócitos do timo, existem vários mecanismos periféricos que previnem a ocorrência de auto-imunidade, constituindo os principais fatores de auto-tolerância. Alguns destes mecanismos consistem na ausência de um sinal co-estimulador, necessário à ativação das células T em adição ao sinal fornecido pela ligação entre o TCR e o complexo MHC/antígeno. Este sinal secundário é obtido, principalmente, pela interação entre a molécula CD28 presente na superfície dos linfócitos T e as moléculas da família B7 (CD80 e CD86), expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (CAA). Na presença de patógenos, as CAA são ativadas e aumentam a expressão das moléculas B7, em nível suficiente para fornecer o sinal secundário e aumentar a produção de IL-2 pelos linfócitos T (PAUL e SEDER, 1994).

A ativação de um linfócito T segue a via $CD3\xrightarrow{\eta}ZAP-70\Rightarrow NFAT$ seguida da via do Ras e da via co-estimuladora (KERSH e ALLEN, 1996). Esta ativação inicia-se após o TCR ligar-se ao complexo MHC/peptídeo antigênico na superfície da CAA, com várias enzimas

tirosina quinases da família Src quinase sendo ativadas e fosforilando os resíduos de tirosina presentes no CD3 e na cadeia ξ do complexo TCR. Subseqüentemente, ocorre a ativação da proteína associada zeta (ZAP-70), uma tirosina quinase não pertencente à família Src, que apresenta capacidade autofosforilativa. Esta molécula é essencial para a manutenção da cascata de sinalização de ativação da célula T. Com a molécula ZAP-70 fosforilada, ocorre a ativação de Ras, que por sua vez, ativa a cascata da proteína quinase-mitógeno ativada (MAP). Esta cascata culmina com a formação de fatores transcricionais, tal qual a proteína de ativação 1 (AP-1) que regula a expressão de genes como *IL2* e *IL4*. Outro fator de transcrição formado em outra via de ativação mas dependente do ZAP-70, é o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), o qual é uma proteína ligante de DNA que auxilia a transcrição do gene *IL2* (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1997).

Um clone auto-reativo de célula T pode permanecer na circulação periférica quando existir um defeito na sinalização das vias de ativação de célula T associado a uma resistência a apoptose. Em camundongos tipo NOD (camundongos diabéticos não-obesos), as falhas na ativação do ZAP-70 interferem na indução da apoptose, pois tanto CD3 ξ e ZAP-70 são necessários para a regulação positiva da expressão do ligante de Fas (CD95). Em humanos o defeito de p65^{lck} está relacionada com um defeito na transdução dos sinais necessários para ativação de célula T e consequente produção de IL-2 (ROSMALEN et al., 2002). Estes fatos contribuem para dificultar a morte programada e permitir a presença de clones auto-reativos na circulação. Além de promover o desencadeamento de auto-imunidade, a ausência da apoptose pode levar a sobrevivência de células tumorais (HAHNE et al., 1996) e de células infectadas com patógenos, como o vírus da imuno-deficiência humana (HIV) (BADLEY et al., 1997).

A morte da célula T é desencadeada por uma via que envolve a molécula Fas e o seu ligante (FasL). O aumento da expressão da molécula Fas em células apresentadoras, que estejam apresentando o auto-antígeno, pode induzir a apoptose das células T via ligante de Fas. Em pacientes com diabetes tipo I foi observada uma menor expressão da molécula ligante de Fas (ROSMALEN et al., 2002).

A inibição da célula T pode ser também obtida pela ligação de maior afinidade que existe entre o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4 ou CD152) com as moléculas B7 (CD86 e CD80) das células B (SHARPE e FREEMAN, 2002). O bloqueio da molécula CTLA-4, em camundongos, acelera a progressão da doença diabetes auto-imune (LÜHDER et al., 2000).

Além da interação entre as moléculas co-estimuladoras, a tolerância imunológica periférica pode ser induzida também por mecanismos como a ignorância imunológica, a deleção, a inibição ou a supressão de clones auto-reativos. A **ignorância imunológica** pode ser decorrente de níveis insuficientes de antígeno para provocar a ativação ou a deleção de células T, bem como pela separação física entre os antígenos e os linfócitos T, tal qual ocorre na barreira hemato-encefálica (BARKER e BILLINGHAM, 1977). A apresentação de antígenos na ausência de co-estimuladores leva a falhas de ativação da célula T e pode culminar com a sua **deleção**. Células T reguladoras podem **inibir** ou **suprimir** outras células T através da produção de citocinas como a IL-10 e o fator transformante de crescimento beta (TGF- β) (KAMRADT e MITCHISON, 2001). Se uma célula T, após o seu contato com o antígeno, não produzir IL-2, ela não está completamente ativada e, portanto, está em anergia. Muitas células T nesta situação produzem IL-10, que suprime a ativação de outras células T (BUER et al., 1998).

A ativação de células T auto-reativas pode ser promovida pela presença de agentes infecciosos, pois, muitos destes agentes possuem antígenos muito semelhantes à auto-antígenos, uma situação denominada mimetismo molecular ou reatividade cruzada (BENOIST e MATHIS, 1998).

O mimetismo molecular pode ser observado em doenças como esclerose múltipla, na qual a resposta auto-imune é iniciada pela infecção com microorganismos patogênicos que apresentam características estruturais semelhantes às do peptídeo 85-99 da proteína mielínica básica (MBP) (WUCHERPFENNIG e STROMINGER, 1995).

Na febre reumática (FR), estreptococos A do grupo β -hemolítico são os responsáveis por induzir tanto a doença aguda quanto a doença reumática cardíaca em indivíduos geneticamente susceptíveis. Nestes indivíduos, a auto-imunidade pode ter sido desencadeada pelo mimetismo molecular existente entre os antígenos estreptocócicos, principalmente o epítipo da proteína M, com os componentes do músculo cardíaco do paciente. GUILHERME et al. (1995) demonstraram que além dos peptídeos originários da proteína M, diferentes peptídeos antigênicos podem ser reconhecidos pelos linfócitos T CD4⁺ isolados nos sítios patológicos de válvula mitral e do miocárdio de pacientes com doença cardíaca reumática crônica.

O pênfigo foliáceo pode ser decorrente do mimetismo molecular entre um suposto antígeno, veiculado pela saliva dos mosquitos da família *Simuliidae*, e o auto-antígeno desmogleína 1 (Dsg1). A coincidência da distribuição dos mosquitos com os focos de PF

(LOMBARDI et al., 1992) permite levantar a hipótese de que este inseto seja o transmissor de um antígeno desencadeador da doença, veiculado pela sua saliva, e o estímulo crônico provocado por este antígeno pode desenvolver uma resposta auto-imune devido a reatividade cruzada deste com a desmogleína 1.

Em virtude de sua função na resposta imune e do elevado grau de polimorfismo, os genes situados no MHC, chamados de genes *HLA* em humanos, estão entre os mais investigados para as associações com doenças auto-imunes. A associação de moléculas HLA com doenças auto-imunes é devida aos aminoácidos polimórficos destas moléculas, que estão localizados no sítio de ligação dos peptídeos antigênicos e que definem a afinidade da ligação destes peptídeos. Portanto, estas moléculas interferem na capacidade de um indivíduo montar uma resposta imune a um antígeno, sendo ele estranho ou próprio (TODD, 1999).

Além dos genes *HLA*, os genes das citocinas, que codificam proteínas de efeitos pleiotrópicos e importantes sinalizadoras entre as células do sistema imune, também são candidatos relevantes nos estudos de auto-imunidade. Uma mudança na concentração local de citocinas, causada pela desregulação da sua produção ou da recepção do seu sinal, pode levar à reativação de células T tolerantes. Alguns polimorfismos identificados nos genes das citocinas parecem controlar, pelo menos em parte, os seus níveis de transcrição. É possível que a auto-imunidade possa ser ocasionada pela reativação de células T tolerantes, decorrentes de uma reação imune inespecífica a patógenos ambientais que poderiam modular citocinas relevantes (SINHA et al., 1990; ARNOLD et al., 1997).

2.3 Pênfigo foliáceo como doença auto-imune

2.3.1 Pênfigo Foliáceo - aspectos imunológicos

Imunologicamente, a doença pênfigo foliáceo é caracterizada pela presença de auto-anticorpos da classe IgG dirigidos contra proteínas desmossomais na superfície dos queratinócitos. No pênfigo vulgar os anticorpos são dirigidos contra um antígeno de 130 kDa, chamado desmogleína 3 (Dsg3) e no pênfigo foliáceo, o anticorpo é dirigido contra a proteína desmogleína 1 (Dsg1) de 160 kDa. Tanto a Dsg1 quanto a Dsg3 formam um complexo com a proteína de junção denominada placoglobina (ANHALT et al., 1990).

As moléculas Dsg1 e Dsg3 são glicoproteínas pertencentes à família das caderinas, que são moléculas de adesão celular (CAM). Ambas Dsg1 e Dsg3 demonstram grande homologia de seqüência protéica, apresentando uma região que contém seis sítios para ligação com íons cálcio, um domínio trans-membrana e um domínio intracelular preso ao citoesqueleto através das proteínas desmossomais da placa e das cateninas. A desmogleína 1 é restrita à camada suprabasal enquanto que a Dsg3 é encontrada em uma camada mais profunda da epiderme (ADAMS et al., 1998). As lesões no PV e PF são conseqüências desta distribuição tecidual de Dsg1 e Dsg3. No PV ocorre manifestação plena de lesões mucosas e epidérmicas, com presença de anticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 e, no PF há anticorpos contra Dsg1 e as lesões têm envolvimento cutâneo bem limitado (AMAGAI et al., 1999).

O PF endêmico se estabelece após uma resposta de anticorpos séricos cujos títulos estão correlacionados com a gravidade da doença (BEUTNER et al., 1968; CRESWELL et al., 1981; WARREN et al., 2000).

Avaliando as subclasses de anticorpos IgG presentes no soro de pacientes com pênfigo foliáceo, através da técnica de imunofluorescência direta, ROCK et al. (1989) constataram que IgG4 depositava-se preferencialmente na superfície de queratinócitos. Além desta subclasse de IgG também foram observadas, em menor título IgG1 e IgG2 e ausência de IgG3. A transferência passiva de auto-anticorpos da subclasse IgG4, em camundongos neonatos, reproduzia as mesmas características clínicas, histológicas e imunológicas do pênfigo. São formadas bolhas na epiderme, após a transferência de anticorpos obtidos de pacientes com PF endêmico, e bolhas profundas após a transferência de anticorpos extraídos de pacientes com PV, estabelecendo que os anticorpos têm um importante papel na indução destas duas formas de doença (ANHALT et al., 1982; ROSCOE et al., 1985; FUTAMURA et al., 1989).

Embora se conheçam os efeitos patogênicos das imunoglobulinas no PF endêmico, através dos experimentos de transferência passiva, o mecanismo patogênico responsável pela acantólise não é completamente compreendido. Dentre os mecanismos propostos, alguns incluem o bloqueio do sítio de adesão da Dsg1 pela ligação direta do auto-anticorpo, resultando no comprometimento da sua capacidade aderente. Outros mecanismos consideram que a ligação do auto-anticorpo promoveria a ativação de um sinal de transdução trans-membrana, que poderia estar envolvido na degradação de moléculas de adesão (AMAGAI et al., 1992; KOCH et al., 1997; LI et al., 2003).

Em um estudo mais recente, WASCHKE et al. (2005) demonstraram em experimentos *in vitro* que a dissociação celular induzida pelos anticorpos IgG do PF não era causa direta do impedimento estérico da interação destes com a desmogleína 1. Estes autores sugerem que os eventos de dissociação promovidos pela IgG do PF devem envolver vias de sinalização celular que são alvos dos auto-anticorpos e que resultam na desestabilização da Dsg1 e dos desmossomos.

Alguns estudos sugerem que a ativação do complemento, liberado pela ligação da Dsg1 com auto-anticorpos, poderia ser importante na patofisiologia da doença (ANHALT et al., 1986; ANHALT et al., 1988; DIAZ et al., 1989). Depósitos do terceiro componente do sistema complemento (C3) e de IgG foram observados nos espaços intercelulares de lesões epidérmicas de PF (MESSIAS et al., 1988). No entanto, experimentos de transferência passiva demonstraram que moléculas IgG4 do PF ou sua fração de ligação com o antígeno (Fab) induziam a formação de bolhas epidérmicas, tanto em camundongos saudáveis como naqueles com deficiência de complemento (ESPAÑA et al., 1997). Apesar destes resultados sugerirem que nenhuma via de ativação do complemento é necessária para a indução da acantólise, eles não excluem a sua possível contribuição, pois a ativação do complemento pode intensificar a movimentação celular produzida pelos anticorpos do pênfigo (ANHALT, 1988; KAWANA et al., 1988).

Durante todo o curso evolutivo do PF, a IgG4 apresenta títulos elevados, enquanto só é observada uma certa elevação dos títulos de IgG1 nas fases iniciais do PF ou durante a recaída da doença (WARREN et al., 2003). Porém a patogenicidade dos auto-anticorpos parece não estar associada com a subclasse, mas com a sua especificidade (LI et al., 2002; LI et al., 2003).

Um estudo recente demonstra que a auto-imunidade no PF evolui a partir de uma resposta não patogênica, com anticorpos dirigidos contra o quinto domínio externo da Dsg1 (EC5), presentes tanto em pacientes quanto em indivíduos saudáveis, para uma resposta patogênica com o surgimento de anticorpos específicos para os dois primeiros domínios da molécula Dsg1 (EC1 e EC2) (LI et al., 2003).

O quinto domínio externo da molécula Dsg1 (EC5) é uma região curta e muito próxima à membrana celular, passível de ser seqüestrado *in vivo*. Estas características podem explicar o motivo pelo qual LI et al. (2003) não encontraram anticorpos anti-EC5, pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), nas preparações histológicas de epiderme humana. Considerando a natureza críptica do domínio EC5, LI et al. (2003) propõem um modelo de

duas fases para explicar os mecanismos imunopatogênicos do PF. Em uma primeira fase, um antígeno exógeno, com homologia de seqüência com EC5 da Dsg1, leva a uma resposta de anticorpos não patogênicos contra Dsg1. Nesta fase não há doença, pois indivíduos saudáveis apresentam anticorpos anti-EC5 no soro. Na segunda fase, em indivíduos geneticamente suscetíveis, há o chamado espalhamento de epítomos, em que novos epítomos da mesma molécula são reconhecidos por linfócitos T ou B em locais em que originalmente não haveria respostas auto-reativas. Este reconhecimento leva à produção de anticorpos patogênicos anti-EC1 e anti-EC2 que induzem a formação de bolhas.

Normalmente, a produção de anticorpos pelos linfócitos B requer estímulos fornecidos pelos linfócitos T. Faz-se necessário, o contato das moléculas co-estimuladoras dos linfócitos T com seus receptores, presentes na célula B e a secreção de citocinas para ativação das células B. A troca de isotipos das imunoglobulinas durante a maturação das células B, levando a formação das sub-classes de IgG anti-Dsg1, geradas nas duas fases do modelo de imunopatogenicidade ao PF proposto por LI et al. (2003), sofre influência das citocinas liberadas durante cada estágio da resposta imune dos pacientes.

LIN et al. (2000) caracterizaram a resposta imune de linfócitos T em pacientes com PF. Estes pesquisadores, através do uso de desmogleína 1 recombinante, analisaram a proliferação de células T obtidas de sangue periférico de pacientes e constataram que eram células T auxiliaadoras (Th = T helper) de memória (CD45RO) tipo Th2, secretoras de IL-4, IL-5 e IL-6 e eram restritas por variantes alélicas de HLA-DR, associadas ao PF. A presença de citocinas secretadas por células T tipo Th2, também foi observada no soro de pacientes com PF (ZEOTI et al., 2000).

2.3.2 Pênfigo Foliáceo - aspectos genéticos

O PF endêmico não pode ser atribuído a um único gene ou a um fator ambiental único. O componente ambiental é evidenciado pelo caráter endêmico da doença, e o componente genético é demonstrado através da freqüência mais elevada de doentes entre membros geneticamente relacionados à pacientes, em comparação à freqüência observada na população geral. Esta desproporcionalidade dos índices indica que há uma predisposição genética a esta doença. MINELLI (1986) relatou que em 506 casos estudados de PF endêmico, 24 destes, ocorriam entre indivíduos geneticamente relacionados.

O PF endêmico, de forma semelhante à grande maioria das doenças auto-imunes, resulta de um efeito cumulativo de múltiplos genes de suscetibilidade, que podem ser independentes ou não, dos quais nenhum é por si próprio necessário ou suficiente para causar a doença. O efeito final do conjunto de genes presentes em um indivíduo, em conjunto com fatores ambientais, será determinante no estabelecimento da auto-imunidade patogênica. Considerando que as doenças auto-imunes são resultantes de desequilíbrios da resposta imune, há vários genes candidatos à predisposição das mesmas. Entre estes, estão os que codificam moléculas que atuam nas vias envolvidas na apoptose, os receptores de antígenos, as moléculas co-estimuladoras, as citocinas que atuam na sinalização da resposta imune, entre outros genes da resposta imune. Os genes *HLA* são os mais importantes, devido à função por eles exercida, e também os mais estudados quanto à predisposição e proteção a muitas doenças auto-imunes.

Uma das abordagens metodológicas usadas para detectar os genes de suscetibilidade de baixa penetrância em doenças complexas como o PF endêmico, é o estudo de associação, comparando pacientes e controles (estudo caso-controle) nas populações.

Ao analisarem uma amostra da população brasileira, PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989) foram os primeiros a realizar um estudo de associação no PF endêmico, avaliando as variantes dos genes *HLA* que conferiam suscetibilidade ou resistência a esta doença. Estes pesquisadores detectaram uma associação positiva entre PF endêmico e DR1 e DR4 e uma associação negativa com DR7 e DQw2 e propuseram que os haplótipos DR7-DQw2 e DR3-DQw2 conferiam proteção ao PF. Em estudos posteriores, com uma população de mestiços brasileiros, MORAES et al. (1991) corroboraram as associações positivas com DR1 (*DRB1*0102*) e associação negativa com DQw2 (*DQB1*02*). Nos índios Xavante, CERNA et al. (1993) demonstraram associação positiva entre PF e DR4 (*DRB1*0404*) e um aumento não significativo estatisticamente de *DRB1*1402*. MORAES et al. (1997) estudando uma população de índios Terena, confirmaram a associação já observada com *DRB1*0404* em ameríndios e também observaram um aumento estatisticamente significativo de *DRB1*1402* e *DRB1*1406*. Estes pesquisadores sugeriram que a suscetibilidade ao PF poderia ser conferida por um epítipo comum, pois os produtos alélicos associados positivamente ao PF, nos diferentes grupos étnicos, compartilhavam a mesma seqüência de aminoácidos nas posições 67-74 da cadeia de DRB1. Esta mesma região, 67-74, motivo LLEQRRAA, também está associada à doença artrite reumatóide e à esclerose múltipla. A posição 71 induz mudanças na especificidade de ligação com o peptídeo a ponto

de alterar o padrão de suscetibilidade ou proteção à artrite reumatóide (HAMMER et al., 1995). Porém PAVONI et al. (2003) ao analisarem a região 67-74, não encontraram nenhum motivo particular que caracterizasse grupos de alelos como de suscetibilidade ou de proteção ao PF. Estes pesquisadores, trabalhando com uma grande amostra de pacientes com PF da população brasileira, demonstraram associação positiva do pênfigo foliáceo endêmico com os alelos *DRB1** 0102, *0404, *0406, *1406 e *1602, e associação negativa com os alelos *DRB1**0301, *0701, *1104, *1301 e *1303 e sugerem que os alelos protetores são semi-dominantes em relação aos de suscetibilidade e dominantes em relação aos alelos neutros, enquanto que os alelos de suscetibilidade são semi-dominantes com relação aos alelos neutros. Estes mesmos autores propõem um mecanismo dependente de dose, no qual indivíduos com dois alelos de suscetibilidade são mais predispostos que aqueles com apenas um alelo de suscetibilidade e um alelo neutro em seu genótipo (PAVONI et al., 2003).

ROXO (2003), trabalhando com as mesmas amostras que PAVONI et al. (2003), detectou associação positiva da doença com os alelos *DQA1**0101, *DQB1**0501, *0502, *0302, *05 e uma associação negativa com os alelos *DQA1**05, *0501, *0103, *0201 e *DQB1**0301, *06, *0201. Tanto os alelos *HLA-DQ* de suscetibilidade, quanto os de resistência têm um efeito dominante sobre os neutros e os alelos de suscetibilidade e de resistência apresentam uma relação de semi-dominância nos locos *DQA1* e *DQB1* (ROXO, 2003).

PETZL-ERLER e MALHEIROS (2005) analisaram polimorfismos do gene *DSG1* que codifica a desmogleína 1, a molécula alvo dos auto-anticorpos patogênicos do PF. Estes autores avaliaram as variantes das posições 809(C,T) e 1660(A,C) do gene *DSG1* e verificaram que as frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas não diferiam estatisticamente entre os pacientes de PF endêmico e controles sadios da amostra brasileira. Entretanto, estes pesquisadores verificaram uma tendência de associação positiva com o genótipo 809 C/C, concordante com associações anteriormente descritas para PF não endêmico na Tunísia e na França. MARTEL et al. (2001) ao analisarem, em uma amostra populacional de francesa a posição 809 (C,T), que apresenta uma transição de timina para citosina, verificaram uma associação positiva do PF com a variante *DSG1**809 C. Segundo estes pesquisadores, a associação com este alelo pode ser explicada pelo seu desequilíbrio de ligação com polimorfismos localizados em outras regiões da sequência codificadora ou reguladora de *DSG1* ou este alelo pode estar localizado em um sítio de processamento alternativo de RNA.

Ao analisar outras regiões do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) que pudessem conter genes, além dos genes *HLA*, envolvidos na fisiopatologia do PF, PEREIRA (2004) estudou nove microssatélites: *D6S265*, *D6S273*, *D6S276*, *D6S291*, *MIB*, *MOGCA*, *RING3CA*, *TAP1CA* e *G51152*, dos quais apenas o último apresentou associações negativas entre PF e os alelos *215, *217, *223 e associação positiva desta doença com o alelo *227. Estes resultados do microssatélite *G51152*, localizado centromericamente ao loco *HLA-DQB1*, confirmam as associações entre PF e as variantes das sub-regiões DR e DQ, já descritas nos estudos anteriores e também não revelam a existência de outros genes do MHC associados ao PF.

Alguns genes das citocinas, cujos produtos atuam como mediadores da resposta imune, também foram analisados em um estudo de associação caso-controle no PF, por PEREIRA et al. (2004) em uma amostra de mestiços brasileiros. Nenhuma associação foi observada com as variantes dos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4R* e *IL10*. Em relação ao polimorfismo -590 do gene *IL4* foi encontrada uma associação positiva com o genótipo T/T. O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de *IL6* -174(C,G) também foi analisado por PEREIRA et al. (2004), que encontraram associação positiva com o alelo G e negativa com o genótipo C/C. Foram também analisadas posições dos genes da linfotóxina α (*LTA* 249, 365 e 720), da proteína de apoptose (*FAS* -1377) e do fator de necrose tumoral α (*TNF* -863 e -308), mas não foi evidenciado um efeito de seus alelos no PF (ROXO et al., 2003). Com respeito à posição -238 do gene *TNF*, foi verificada apenas uma associação negativa discreta com o alelo *238A (OR = 0,45; $P = 0,047$).

2.4. Citocinas

2.4.1. Citocinas e Linfócitos

Os linfócitos T auxiliares (Th) são as principais células reguladoras do sistema imune. Tanto a sua ativação quanto supressão são obtidas através da sua interação íntima com outras células. Após a ligação do receptor da célula T (TCR) com o complexo MHC + peptídeo antigênico, presente nas células apresentadoras de antígeno (CAA), é necessário uma série de interações entre as moléculas de superfície celular das CAA com moléculas de

superfície de célula T, que culminam com o desencadeamento de importantes sinais para ativação da célula T.

A diferenciação de uma célula Th em Th1 ou Th2 depende das condições apresentadas aos linfócitos T virgens (Th0), que representam o conjunto de células T recém-chegadas ao timo e que ainda não contataram antígenos. Entre estas condições se incluem o tipo de CAA presente no local, a quantidade do antígeno, a afinidade química do antígeno com a molécula MHC, a interação entre TCR e o complexo MHC + peptídeo e a afinidade das ligações entre as moléculas co-estimuladoras (HSIEH et al., 1993; MURPHY et al., 2000).

A diferenciação Th1 e Th2 parece estar sob a regulação de diferentes mecanismos, entre eles a expressão diferencial de receptores de citocinas e de fatores de transcrição (TODD et al., 1993; MURPHY et al., 2000).

A distinção fenotípica entre Th1 e Th2 foi obtida de estudos de resposta de células Th em modelos experimentais de doenças infecciosas em camundongos. Conforme o tipo fenotípico do linfócito Th requerido no processo infeccioso e o padrão característico de citocinas secretadas pelo grupo específico de célula Th, a patofisiologia da doença é condicionada a uma resposta imune celular (Th1) ou humoral (Th2) (LIEW et al., 1989).

Assim como em murinos, nos experimentos com células humanas, o tipo celular Th1/Th2 também interfere na natureza da doença. Sendo assim, as células Th1 apresentam um efeito imunológico pró-inflamatório, pois produzem citocinas como $IFN\gamma$ (interferon γ), IL-2, $TNF\alpha$ (fator de necrose tumoral α) e LTA (linfotóxina α), que induzem a secreção de anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento pelas células B, ativam macrófagos e promovem a citotoxicidade celular e a imunidade mediada por células. Por outro lado, as células Th2, que secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, promovem uma resposta humoral, inclusive com a produção de anticorpos da classe IgE, favorecem a diferenciação e ativação de eosinófilos, mas suprimem a imunidade mediada por células (PAUL e SEDER, 1994).

A IL-12 e a IL-4 são duas importantes citocinas que atuam na diferenciação de Th0 para Th1 e Th2, respectivamente, e também atuam como inibidores da diferenciação. Em ensaios *in vitro*, realizados na ausência de IL-12, que é essencial para a expressão de $IFN\gamma$, IL-4 é capaz de bloquear completamente o desenvolvimento de Th0 para Th1 (SEDER et al., 1993).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas de baixo peso molecular, igual ou inferior a 30kDa, secretadas pelos leucócitos e por uma variedade de outras células. As citocinas apresentam ações pleiotrópicas e redundantes, características estas que lhes permite

atuarem em diferentes tipos celulares produzindo diferentes efeitos. Quando se faz o bloqueio de uma citocina em particular, raramente ocorre um efeito biológico dramático, pois diferentes citocinas apresentam ações semelhantes.

As citocinas atuam por meio de uma rede bastante complexa, que envolve a interação com seus receptores de superfície celular específicos os quais apresentam alta afinidade pelo seu ligante. Após esta interação, as citocinas são capazes de exercer ações biológicas de estímulo ou de repressão, tanto com efeitos no local da sua secreção ou à distância de sua síntese. A sua atividade pode desencadear um efeito em cascata, ativando outros genes que induzem processos de divisão celular, proliferação, diferenciação, migração ou apoptose das células envolvidas (VILCEK, 2003).

Uma vez que as citocinas e seus receptores desempenham importantes funções de regulação na inflamação e nas respostas imunes, alterações na sua produção podem contribuir para o início e/ou a manutenção de doenças auto-imunes (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1997). A regulação da resposta imune se deve principalmente à atuação das citocinas na polarização das células Th, pois a maioria das funções deste tipo de célula ativada é obtida pela liberação de citocinas, que podem ativar clones de células T auto-reativos, Th1 ou Th2. Estes clones que são importantes na patogênese das doenças auto-imunes como na artrite reumatóide, com perfil Th1 (ZANELLI et al., 1995) e no PF endêmico com perfil Th2 (LIN et al., 2000).

2.4.2. As citocinas IL-13 e IL-4 e suas relações com doenças complexas

As manifestações clínicas do PV e do PF são uma conseqüência da resposta imune inicial contra o antígeno-alvo Dsg3 e Dsg1, respectivamente, o que leva à ativação de linfócitos T com conseqüente acúmulo de auto-anticorpos na epiderme, desencadeando a patologia. As citocinas produzidas por estas células e outras do processo inflamatório presentes no pênfigo, também são de interesse para os estudos que buscam uma melhor compreensão da fisiopatologia desta doença.

Muitas citocinas secretadas pelos queratinócitos (IL-1, IL-2, IL-3 e IFN- γ) estão envolvidas em doenças de pele. FELICIANI et al. (2000) verificaram se estas, entre outras, estavam relacionadas com a patogênese do PV. Em culturas de queratinócitos de pacientes com PV, os anticorpos anti-TNF α e anti-IL-1 inibiam *in vitro* a acantólise induzida por IgG. As citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IL-1, podem induzir o aumento na expressão do

terceiro componente do sistema complemento (C3) e a exacerbação do processo de acantólise (FELICIANI et al., 1999).

Pacientes portadores de PV apresentavam níveis séricos de IL-6 e TNF α significativamente aumentados que se correlacionavam com a gravidade da doença (D'AURIA et al., 1997). Os pacientes com PF demonstram expressão mais intensa dos transcritos dos genes *IL6* e *TNF* na bolha acantolítica do que aqueles que manifestavam outros tipos de pênfigo (LÓPEZ-ROBLES et al., 2001).

Apesar dos resultados de estudos com queratinócitos indicarem a presença de citocinas pró-inflamatórias, as análises das citocinas expressas pelas células T, obtidas do sangue periférico ou das lesões de PF endêmico, sugerem a predominância de citocinas anti-inflamatórias, perfil tipo Th2 (LIN et al., 1997; LIN et al., 2000). Dentre estas, IL-13 e IL-4 podem atuar localmente para controlar o processo inflamatório e, em nível sistêmico, a IL-4 pode estar estimulando clones de células T auto-reativos para a desmogleína 1. Ambas citocinas podem estar sinalizando as células B auto-reativas a produzirem anticorpos da subclasse IgG4, a que predomina no PF.

A IL-4 é a citocina mais importante na polarização das células Th0 em Th2 e atua principalmente na fase indutora da resposta imune predominantemente Th2. Este tipo de resposta confere imunidade protetora principalmente contra helmintos, mas também pode levar a manifestações atópicas caracterizadas pela presença de asma, eczema, rinoconjuntivite e um aumento de IgE no soro (SHIRAKAWA et al., 2000). Entre outros efeitos de IL-4, inclui-se a inibição da imunidade celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF α e a estimulação da molécula antiinflamatória IL-1Ra (VANNIER et al., 1992).

As citocinas IL-13 e IL-4 compartilham certas características funcionais, incluindo a indução de células dendríticas e estimulação da síntese de imunoglobulinas pelas células B. Em processos asmáticos, foi detectado que as citocinas IL-4 e IL-13 regulam a mudança de isotipo das células B para a síntese de IgE, induzem a expressão de moléculas HLA de classe II e de CD23 (MINTY et al., 1993). Promovem, também, a mudança de isotipos das células B para IgG4, induzem a expressão de moléculas de adesão, a produção de quimiocina (eotaxina), ativam mastócitos e eosinófilos e inibem a expressão de genes das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF α , e IL-6, pois diminuem a atividade macrofágica (LAUNDY et al., 2000).

Assim como IL-4, a IL-13 também pode levar à atopia, desempenhando um papel crítico na patogênese da asma, que é uma doença comum do trato respiratório caracterizada

pela obstrução nas vias aéreas, causada pela inflamação aguda ou crônica dos brônquios. A IL-13 tem a capacidade de interagir diretamente com células das vias aéreas, como células epiteliais e do músculo liso. Além disso, apesar de não serem conhecidos os mecanismos moleculares envolvidos na asma, esta citocina pode estimular um conjunto de genes considerados pró-asmáticos, como a eotaxina, proteína quimiotática 1 de monócitos, e fatores de crescimento, como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) (SYED et al., 2005).

Apesar dos efeitos de IL-13 e IL-4 nos linfócitos B serem semelhantes, as suas ações não são idênticas. Os níveis de IgG4 e IgE produzidos pelas células B em resposta a IL-13 são geralmente menores que aqueles induzidos por IL-4. Como as células T são necessárias para a ativação, expansão clonal, diferenciação e regulação das mudanças de isotipos nas células B, a ausência de um receptor funcional de IL-13 na superfície do linfócito T, torna esta célula incapaz de ser ativada pela IL-13, fato este que pode explicar, parcialmente, as diferenças de concentração de IgG4 e IgE quando as células B são induzidas por IL-13 e por IL-4 (COFFMAN et al., 1988; PUNNONEN et al., 1993). Assim, entre estas duas citocinas, apenas IL-4 é capaz de controlar a diferenciação em Th2 e está envolvida na iniciação da resposta Th2, enquanto que IL-13 está relacionada com as funções efetoras deste tipo de resposta (VLADICH et al., 2005).

O receptor da interleucina 4 (IL4R), uma proteína transmembrânica de 140kDa, presente nas células hematopoéticas, endoteliais, epiteliais, musculares, cerebrais, fibroblastos e hepatócitos, é um componente essencial para a indução do fenótipo Th2 e produção de IgE. Em camundongos nocauteados para o gene *IL4R* e para o gene que codifica o seu ligante, *IL4*, não ocorre indução específica de IgE e nem uma hiper-responsividade brônquica, característica da asma, demonstrando papel relevante da via *IL4/IL4R* no aparecimento destes sintomas (HOWARD et al., 2002). A interleucina 13 também contribui para a manutenção do perfil Th2 e a elevação dos níveis basais de IgE. A sobreposição de ações entre IL-4 e IL-13 deve-se ao compartilhamento de uma das cadeias do complexo dimérico de seus receptores (WILLS-KARP, 2000).

O receptor de IL-4 é um complexo heterodimérico que inclui a cadeia IL-4R α fundamental para a ligação de IL-4. A ligação de alta afinidade da IL-4 com IL-4R α promove a dimerização da cadeia alfa com uma segunda cadeia polipeptídica que pode ser a cadeia gama (IL-2R γ) ou a cadeia do receptor de IL-13 (IL-13R α 1). Por outro lado, o receptor de IL-

13 é composto por uma sub-unidade de IL-4R α em combinação com a sub-unidade de baixa afinidade IL-13R α 1 ou com a sub-unidade de alta afinidade IL-13R α 2.

Pelo fato de utilizarem a mesma cadeia IL4R α como um dos componentes de seus receptores, ambas citocinas compartilham a utilização de algumas vias de sinalização. As regiões carbóxi-terminais de IL-4R α e de IL-13R α 1 iniciam a cascata de sinalização, no estado dimerizado ou isoladamente, via quinases de tirosina da família Janus (JAK), as quais promovem interações com o fator de transcrição STAT6, que, por sua vez, se liga às seqüências consenso nas regiões promotoras dos genes regulados pela IL-4 e/ou IL-13 (NELMS et al., 1999; KELLY-WELCH et al., 2003).

Apesar de IL-4 e IL-13 compartilharem muitas das propriedades biológicas, as ações de IL-13 são menos abrangentes que as de IL-4 e isto se deve à expressão do seu receptor específico, IL-13R. O complexo do receptor de IL-13 é expresso em células B, monócitos-macrófagos, basófilos, mastócitos, células endoteliais, certos tipos de células tumorais e em células não hematopoéticas, mas não é encontrado em células T (ZURAWSKI et al., 1993).

A cadeia IL-13R α 2, ao contrário da IL-13R α 1, é expressa em vários tecidos, com exceção dos linfócitos T e B e, também na forma solúvel, identificável no soro e na urina (SHIRAKAWA et al., 2000). IL-13R α 2 é considerado um regulador negativo da atividade de IL-13 *in vivo* e a sua expressão é aumentada pela presença da própria IL-13 e também é dependente de IL-10 e STAT6 (CHIAMARONTE et al., 2003; MENTINK-KANE et al., 2004). Este receptor se liga com alta afinidade a IL-13, mas não promove nenhuma sinalização intracelular. Em murinos, a região citoplasmática de IL-13R α 2 não apresenta um motivo de sinalização comum à cadeia α dos receptores, como IL-13R α 1, ou ainda uma seqüência de ligação JAK/STAT, o que pode indicar que este receptor desempenhe um papel de regulação negativa da resposta imune também em murinos (WYNN, 2003). Esta hipótese pôde ser confirmada nos trabalhos de CHIAMARONTE et al. (2003) que, ao investigarem a regulação e a função de IL-13R α 2 em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, verificaram que a fibrose no fígado, dependente de IL-13, aumentava drasticamente na ausência de IL-13R α 2 nos tecidos, mesmo ocorrendo um decréscimo significativo de IL-13 no soro e no fígado. Estes resultados demonstraram que IL-13R α 2 tem um importante papel em inibir a resposta imune crônica ou patogênica do tipo Th2.

MENTINK-KANE et al. (2004), ao trabalharem com indivíduos infectados com *Schistosoma mansoni*, detectaram concentrações séricas maiores de IL-13R α 2 à medida que

aumentava a intensidade da infecção, caracterizando um prolongamento da cronicidade da doença.

2.5. Auto-imunidade e receptor de morte programada PD-1

A ativação de linfócitos T ocorre com a interação entre seu receptor e o complexo MHC + peptídeo antigênico e também com a interação entre moléculas receptoras acessórias, que em conjunto induzem a ativação ou a anergia da célula T. O balanço entre os estímulos inibidores e estimuladores é importante para a manutenção da tolerância periférica e uma falha neste processo pode causar a auto-imunidade.

Recentemente, foi descoberto um novo conjunto de receptores presentes nas células T capazes de induzir, (ICOS/ICOS-L), ou reprimir (PD-1/PD-L1 ou PD-L2) a resposta imune específica. A molécula imuno-mediadora induzível de linfócitos (ICOS: *activation-inducible lymphocyte immunomediatory molecule*) é expressa em linfócitos T ativados e fornece sinais positivos para os mesmos pela interação com o seu ligante ICOS-L (também conhecido por B7h, GL50, B7RP-1, LICOS ou B7-H2). Este ligante é expresso na superfície de células B, macrófagos e tecidos linfóides periféricos (OKAZAKI, IWAI e HONJO, 2002). PD-1 (receptor de morte celular programada ou, em inglês *programmed cell death 1*) é um receptor de regulação negativa presente em células da linhagem mielóide e linfócitos T e B.

Experimentos em camundongos deficientes da molécula PD-1 provocaram doenças auto-imunes como lupus eritematoso, glomerulonefrite, artrite e cardiomiopatia auto-imune fatal, demonstrando que a interação PD-1 com seus ligantes desempenha um importante papel na regulação da tolerância periférica (NISHIMURA e HONJO, 2001).

A perda da expressão de PD-1 *in vivo* resulta em um fenótipo variável e dependente do genótipo dos camundongos analisados (WATANABE et al., 2003). Em camundongos sem PD-1 e da linhagem C57B1/6, ocorre aumento dos níveis séricos de IgG3, glomerulonefrite, artrite com deposição de C3 e IgG3, esplenomegalia e sintomas semelhantes ao lupus eritematoso sistêmico. Em camundongos da linhagem BALB/c, a ausência de PD-1 leva à cardiopatia com dilatação ventricular mediada por anticorpos da classe IgG1, direcionados contra um antígeno cardíaco, a troponina I. Os sintomas de auto-imunidade mais graves nestes

animais são observados após um período de vida mais longo, quando comparados com aqueles sintomas mais graves e de ocorrência mais precoce quando na ausência da expressão de CTLA-4 (CHAMBERS, 2001).

Tanto CTLA-4 quanto PD-1 regulam a resposta de células T, mas aparentemente, PD-1 é menos potente que CTLA-4 nesta regulação. Entretanto, PD-1 tem maior influência na homeostasia de células B do que CTLA-4, uma vez que a proliferação de células B é o principal defeito decorrente da ausência da expressão de PD-1. Desta forma, PD-1 limita a ativação de linfócitos B auto-reativos, após se ligar com seus ligantes PDL-1 e PDL-2.

Ao contrário da expressão induzível de CD80 e CD86 em células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e em certos tipos de fibroblastos e células epiteliais, os ligantes de PD-1 e de ICOS são expressos de forma induzível no sistema linfóide e também constitutivamente em células parenquimatosas, em tecidos não linfóides, como coração, placenta, pulmões, rins e queratinócitos, além das células apresentadoras de antígeno (FREEMAN et al., 2000; LATCHMAN et al., 2001; OKAZAKI, IWAI e HONJO, 2002). Estes ligantes são também expressos em células tumorais, levando a uma inibição da imunidade anti-tumoral e sobrevivência do tumor por um período maior em ensaios *in vitro* e *in vivo* (IWAI et al., 2002).

A interação entre PD-1 e seus ligantes leva à inibição da proliferação de células T e um decréscimo significativo na produção de IFN- γ e IL-10 (FREEMAN et al., 2000) e também a uma inibição na produção de IL-2 pela célula T, mesmo na presença de estímulos e de ativação prolongada, levando a célula T ao estado de anergia (CARTER et al., 2002). Aparentemente PD-L2 é menos potente que PD-L1 em inibir a ativação de linfócitos T (LATCHMAN et al., 2001), mas é mais eficaz em inibir a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 (BROWN et al., 2003).

Devido aos locais de expressão das moléculas de PD-1 e PD-L1, a interação entre estas pode permitir a regulação de linfócitos potencialmente auto-reativos nos sítios de ativação da resposta imune e nos sítios aonde ocorrem respostas imunes efetoras (FREEMAN et al., 2000).

Os mecanismos pelos quais as moléculas PD-1 exercem seus efeitos são ainda muito especulativos. A interação simultânea do TCR com o peptídeo antigênico / MHC e a interação do PD-1 com PD-1L ou PD-2L, pode promover a fosforilação das tirosinas e ativação das fosfatases contendo domínio SH-2 (SHP-2), levando à defosforilação de moléculas de sinalização e à redução na síntese de RNA mensageiro das citocinas. O mesmo ocorre em

células B, quando houver a interação simultânea do receptor de célula B com seu antígeno e interação do PD-1 com seus ligantes (SHARPE e FREEMAN, 2002).

Ensaio *in vitro*, de expressão da molécula PD-L1, sugerem que a interação PD-1 e PD-L1 possa ser importante nos locais de inflamação ou da resposta imune. Em queratinócitos e monócitos analisados *in vitro*, ocorre um aumento da expressão de PD-L1 após estímulo de IFN- γ e de outras citocinas inflamatórias, porém após a interação deste ligante com PD-1, ocorre uma redução significativa na produção das citocinas inflamatórias (FREEMAN et al., 2000). Estes resultados sugerem que a interação PD-1 com PD-L1 é um importante mecanismo de limitação da atividade de células T e B, principalmente no coração e rins, órgãos nos quais PD-L1 é altamente expresso.

A importância da interação PD-1 com PD-L1 foi também observada por outros pesquisadores, entre eles, NISHIMURA et al. (2001) que estudaram o desenvolvimento de cardiomiopatia em camundongos com deficiência de PD-1. A interação entre PD-1 e seu ligante PD-1L estava comprometida e havia auto-anticorpos reativos contra uma proteína de 30 kDa específica do músculo cardíaco. Concluíram que a expressão de PD-L1 em células do músculo cardíaco permite reprimir a proliferação de linfócitos T auto-reativos garantindo, possivelmente, a prevenção da doença auto-imune através da interação PD1/PD-L1.

SALAMA et al. (2003) confirmaram a importância da interação PD-1 com PD-L em limitar o processo inflamatório na encefalomielite auto-imune experimental. Esta interação leva à inibição tanto de células T CD4⁺ quanto de células T CD8⁺, além de desempenhar um importante papel na resistência à doença em animais deficientes em CD28.

2.6 Genes *IL4*, *IL13* e *PDCD1*

2.6.1 Estrutura e variabilidade dos genes *IL4* e *IL13*

MINTY et al. (1993) foram os primeiros a descobrirem, por clonagem molecular, o gene *IL13*, que é expresso em linfócitos T humanos ativados. Este gene está localizado em 5q31 e está organizado em 4 exons e 3 introns, perfazendo um total de 3 kb. O seu produto foi isolado primeiramente por MCKENZIE et al. (1993) a partir do DNA complementar de *IL13* e é uma proteína de massa molecular relativa de 10kDa.

A região cromossômica na qual o gene *IL13* se encontra, está disposta em uma extensão aproximada de 3Mb (mega bases) e apresenta um agrupamento de diferentes genes que codificam fatores de crescimento os quais participam na proliferação, diferenciação e ativação das células hematopoéticas e do sistema imune (SMIRNOV et al., 1995). Estão presentes, nesta região, além do gene *IL13*, os genes *IL3*, *IL4* e *IL5* e também o gene do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (*GM-CSF*, *CSF2*).

SMIRNOV et al. (1995) demonstraram que o gene *IL13* está localizado a 5' do gene *IL4*, distante 12 kb do mesmo. O gene *IL4*, assim como *IL13*, apresenta 4 exons e 3 introns e semelhanças a *IL13* na organização interna, com sítios de ligação para fatores transcricionais comuns a ambos. Estas características levaram à sugestão de que estes dois genes tenham surgido a partir de um evento único de duplicação ao longo da evolução (SMIRNOV et al., 1995; WILLS-KARP, 2000). Além disso, existe uma região reguladora entre os genes *IL4* e *IL13*, que controla de modo coordenado a expressão dos genes do agrupamento 5q31 (GRÜNIG, deVRIES e MALEFYT, 2003).

Os produtos gênicos de *IL4* e *IL13* interagem com a cadeia α do receptor de IL-4, cujo gene está localizado no cromossomo 16, em 16p11.2-12.1 (PRITCHARD et al., 1991). A IL-13 interage também com seu receptor específico constituído pela cadeia $\alpha 1$ do receptor de IL-13 (*IL-13R α 1*) associada à cadeia $\alpha 2$ (*IL-13R α 2*). As cadeias *IL-13R α 1* e *IL-13R α 2* são proteínas transmembrânicas glicosiladas com 70kDa e 65 kDa, respectivamente, cujos genes (*IL13RA1* e *IL13RA2*) estão localizados no braço longo do cromossomo X, (Xq24) (GRÜNIG, deVRIES e MALEFYT, 2003).

Diferentes polimorfismos nos genes destes receptores (*IL4R* e *IL13RA1*, com exceção do gene *IL13RA2*, cuja variabilidade não foi relatada até o momento), bem como nos genes que codificam seus ligantes (*IL4* e *IL13*) podem interferir de um modo complexo na regulação destas interleucinas e contribuir para a manifestação de um fenótipo de doença.

Variantes dos genes localizados na região 5q31 estão relacionadas com atopia e a um aumento no nível de IgE no soro (MARSH et al., 1994; MEYERS et al., 1994), associados com asma (NOGUCHI et al., 1997), com diabetes tipo 1 (BUGAWAN et al., 2003) e com doença de Graves (HIROMATSU et al., 2005).

Vários polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs- *single nucleotide polymorphisms*) foram detectados nos genes *IL4*, *IL13*, *IL4R* em associação com asma. VAN der POUW et al. (1999) identificaram um SNP na região promotora do gene *IL13* na posição -1111(C,T), associado com a asma alérgica na população holandesa. Indivíduos homocigotos

T/T apresentavam níveis de IL-13 *in vitro* significativamente maiores do que os indivíduos C/T ou C/C, o que levou a estes pesquisadores proporem que a variante T resulta em um aumento na ligação de proteínas nucleares ativadoras na região promotora do gene *IL13*. Em pacientes asmáticos, a variante *IL13-1111T* poderia aumentar os níveis de transcrição de IL-13 por aumentar a ligação de proteínas nucleares, entre elas, o fator nuclear de linfócitos T ativados (NFAT) (HOWARD et al., 2001). Distintas proteínas NFAT regulam de modo diferenciado a expressão dos genes *IL13* e *IL4*. NFAT-c pode ser uma proteína reguladora positiva, enquanto que NFAT1 e NFAT4 podem atuar como repressoras na produção de citocinas tipo Th2.

Em outros estudos, demonstrou-se que a variante *IL13-1111T* está associada com dermatite atópica e alergia por inalação de substâncias alergênicas (HUMMELSHOJ et al., 2003) e com aumento nos níveis de IgE sanguíneo (HIROMATSU et al., 2005).

No exon 4 de *IL13* existe uma transição de G para A, na posição +2044, o que leva a uma substituição dos aminoácidos arginina (R) para glutamina (Q) no códon 110 ou 130 (caso sejam incluídos na contagem os 20 aminoácidos do peptídeo sinal). A glutamina nesta posição, está associada com a elevação dos níveis de IgE total no soro, com dermatite atópica e com asma nas populações alemã, norte-americana e inglesa e na população japonesa (GRAVES et al., 2000; HEINZMANN et al., 2000; LIU et al., 2000).

Modelos computacionais sugerem que a arginina na posição 130 esteja diretamente envolvida na interação da IL-13 com seu receptor e que a mudança de carga, promovida pela troca para glutamina poderia afetar a interação de IL-13 com a cadeia IL-13R α 1 do seu receptor, acarretando diferentes propriedades biológicas (NOGUCHI et al., 2001). HEINZMANN et al. (2000) propõem que a expressão da variante glutamina nesta posição possa resultar em uma proteína com aumento na afinidade de ligação pelo seu receptor. A alta atividade de IL-13 pode explicar muitas das características dos processos alérgicos, como aumento de IgE, hipersecreção de mucosas e inflamação com predomínio de eosinófilos. Porém, CELEDÓN et al. (2002) não encontraram associações entre as variantes *IL13R130Q* e os níveis de IgE no soro de indivíduos asmáticos de uma amostra da população da Costa Rica. A ausência de associação foi explicada, por aqueles pesquisadores, como decorrente de vários fatores tais quais a heterogeneidade étnica da amostra analisada, as diferenças de exposição ambiental quando comparadas com indivíduos de outros países, como Inglaterra, Japão, Estados Unidos e Alemanha e, as diferenças nas interações gênicas envolvidas na manifestação do fenótipo asma.

Ao se analisar a relação entre estrutura e função de IL-13 e seus receptores, sugere-se que a troca de uma arginina (R) por glutamina (Q) na posição 130, possa conferir à variante Q a habilidade de se ligar com a subunidade γ c do complexo de receptor IL-4R α , cadeia esta, que interage com os resíduos de aminoácidos neutros das citocinas IL-4 e IL-2 e que normalmente não se liga a IL-13. Levanta-se a hipótese de que a presença de resíduos de aminoácidos positivamente carregados (R) na IL-13 impeça a interação desta com a cadeia γ c do receptor. A substituição da R130 por glutamina ocorre na cadeia α da hélice D, uma região crítica da molécula IL-13 para as interações com os seus receptores. A troca deste aminoácido de carga positiva por glutamina, com carga neutra, poderia mudar o potencial eletrostático da superfície entre as duas moléculas, a ponto de permitir a ligação entre IL-13 e a cadeia γ c do receptor IL4R. Deste modo, a molécula IL-13, com a variação 130Q decorrente do alelo *IL13+2044A*, seria capaz, assim como a IL-4, de afetar a diferenciação de Th2 e de contribuir para o aumento da inflamação, característica dos processos alérgicos.

Esta hipótese foi, no entanto, refutada nos estudos de VLADICH et al. (2005) que demonstraram que a isoforma da citocina IL-13 codificada pela variante *IL13+2044A* não promovia estímulo nas células T CD3⁺, indicando que este alelo está mais relacionado com o aumento das funções efetoras mediadas pela IL-13 do que na interferência na modulação da diferenciação em Th2.

Uma outra possível explicação para justificar a maior atividade de IL-13 nos indivíduos portadores da variante *IL13+2044A* foi descrito por ARIMA et al. (2002), que propuseram que a variante Q apresenta maior estabilidade em relação à variante R. Esta estabilidade seria decorrente da menor afinidade da variante Q pela cadeia α 2 do receptor de IL-13, o que promoveria uma menor taxa de eliminação da molécula IL-13 da circulação. ARIMA et al. (2002) observaram níveis médios mais elevados de IL-13 nos indivíduos homozigotos para a variante Q, do que naqueles não homozigotos para esta variante. Confirmando a possível estabilidade da IL-13 com seu receptor, CHEN et al. (2004) demonstraram nos ensaios *in vivo* o aumento da atividade da variante Q130 *IL13* em comparação à variante *R130IL13*.

Foram descritos quatro SNPs na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *IL13*: +2525 (G,A), +2580 (C,A), +2749 (C,T) e +2841 (T,G) em holandeses e chineses (VAN der POUW et al., 1999; HOWARD et al., 2001; WEI et al., 2005); e esses três primeiros SNPs foram descritos em alemães e em norte-americanos (GRAVES et al., 2000). O significado biológico destes SNP é desconhecido, mas é possível que polimorfismos na região 3'UTR tenham

relação com a estabilidade do RNA mensageiro, com a regulação do *splicing* e com a expressão do produto gênico (GRAVES et al., 2000).

Em chineses com síndrome nefrótica, os pacientes em remissão, e portadores do haplótipo constituído por três SNPs da região 3'UTR [+4738A_+4793A_+4962T ou AAT], apresentavam um aumento significativo na expressão do RNA mensageiro de *IL13* quando comparados aos pacientes com o haplótipo [+4738G_+4793C_+4962C ou GCC] (WEI et al., 2005). O SNP +4738 corresponde ao SNP +2525, sendo neste último a contagem das posições realizada a partir do códon de iniciação. Esses autores sugerem que os polimorfismos na região 3' não traduzida do gene *IL13* interferem na expressão de citocinas e estão relacionados com o resultado a longo prazo da síndrome nefrótica. WEI et al. (2005) verificaram que o grupo de pacientes com o haplótipo GCC tem maiores índices de remissão da doença, por apresentarem um decréscimo na eficiência da tradução da *IL13*, enquanto o grupo de pacientes reincidentes na doença apresenta um excesso do haplótipo AAT, o qual promove maior expressão desta citocina. Entre os polimorfismos localizados na região 3'UTR, pesquisaremos apenas a associação entre o PF e o SNP *IL13* +2525 (G,A).

Devido aos efeitos da IL-13 nos processos alérgicos inflamatórios, foram desenvolvidos estudos sobre a associação de SNPs deste gene e suas combinações com SNPs dos genes codificadores das cadeias α dos receptores de IL-13, como IL-4 α R e IL13R α 1 (HOWARD et al., 2002; BUGAWAN et al., 2003; HE et al., 2003; CHEN et al., 2004; VLADICH et al., 2005).

Como as citocinas interagem com seus receptores em uma rede complexa, é importante observar se as variações individuais de um gene modificam a atividade de uma certa proteína que atua em uma via comum, culminando em um efeito maior. O significado funcional de um dado SNP pode se tornar evidente apenas quando analisado em conjunto com SNPs localizados no mesmo gene ou em genes diferentes. Estudos deste tipo vêm demonstrando interações gênicas de *IL4RA* com *IL13* (HOWARD et al., 2002; CHEN et al., 2004).

Foram identificados três SNPs no gene *IL13RA1*. Dentre estes, a variante A (*A1398G*), presente na região 3' não traduzida (3'UTR), é relativamente comum na população inglesa. Encontra-se associada positivamente com o nível de IgE na população de asmáticos da Inglaterra (HEINZMANN et al., 2000).

Em relação ao gene que codifica a cadeia IL13R α 2, SYED et al. (2005) demonstraram aumento na expressão do mesmo nas células de músculo liso das vias aéreas. Estes

pesquisadores propõem que o aumento na transcrição deste gene deva ser decorrente do papel regulador que a $IL13R\alpha2$ exerce, limitando a atividade de IL-13 nestas células.

MARSH et al. (1994), foram os primeiros a relatar associação entre IL-4 e os altos níveis de IgE no soro de indivíduos da comunidade Amish. Desde então, muitos pesquisadores estão estudando polimorfismos nas regiões reguladoras de *IL4*, que possam estar contribuindo na suscetibilidade a doença, pela super-expressão do produto gênico e subsequente ampliação da diferenciação de células T para o tipo Th2 (TODA e ONO, 2002). Vários polimorfismos nas regiões promotoras, entre eles $+33C,T$ e $-590C,T$, podem conter elementos de ação em *cis* que regulem a produção, a degradação e a localização dos transcritos (SUZUKI et al., 2000).

A IL-4 está presente também no cérebro humano, possivelmente controlando a resposta da micróglia à proteína amiloide β , relacionada com a doença de Alzheimer (DA). A IL-4 poderia desempenhar um papel na patologia inflamatória observada nas placas senis da DA. O SNP presente na região 5' não traduzida do *IL4*, $+33C,T$, foi estudado por SHIBATA et al. (2002), em pacientes com DA, uma vez que o ganho ou a perda de atividade de IL-4 pode ter associação com a redução do risco para o desenvolvimento da doença. Porém, estes pesquisadores não encontraram associações entre as variantes T ou C com DA. Este mesmo polimorfismo foi analisado por SUZUKI et al. (1999) que observaram uma associação positiva entre a variante $+33T$ e níveis elevados de IgE no soro de indivíduos asmáticos de uma população japonesa.

BUCHS et al. (2000) estudaram, em pacientes com artrite reumatóide, o polimorfismo de número variável de repetições em tandem (VNTR), de 70pb de repetição, localizado no intron 3 do gene *IL4*. Os autores sugerem que o alelo 2 está mais relacionado com proteção contra a destruição das articulações do que com a suscetibilidade ao desenvolvimento da artrite reumatóide.

PEREIRA et al. (2004) analisaram o SNP *IL4-590* em uma amostra de indivíduos caucásios brasileiros e encontraram uma associação positiva fraca entre o genótipo T/T e o PF endêmico. Também foi identificada uma associação negativa fraca com o alelo C, nesta mesma amostra.

2.6.2. Estrutura e variabilidade do gene *PDCD1*

Originalmente, o gene que codifica a molécula PD-1 foi isolado dos demais genes que se expressavam durante o processo de apoptose em linhagens de células pró-B e em hibridomas de células T de murinos. FINGER et al. (1997) sugerem que este gene tenha uma maior importância na diferenciação de células B do que no processo apoptótico em si, uma vez que a sua presença diminui a expressão dos genes *RAG1* e *RAG2* nas células B.

O gene *PDCDI* contém 5 exons, perfazendo um total de 9,6 kb e está localizado em 2q37.3 (SHINOHARA et al., 1994). A região flanqueadora a 5' se caracteriza pela ausência de elementos reguladores em *cis* usuais, como TATA e CAAT. Apresenta, entretanto, um grande número de sítios de ligação para fatores de transcrição e um sítio de início de transcrição dominante (FINGER et al., 1997). O seu produto é uma proteína transmembrânica de 288 aminoácidos com 55kDa e apresenta, na porção extracelular, uma região homóloga ao domínio variável das imunoglobulinas e dois domínios hidrofóbicos. Um destes domínios hidrofóbicos é o domínio trans-membrânico de PD-1; na região citoplasmática há duas tirosinas sendo uma delas pertencente ao imuno-receptor de inibição com motivo em tirosina (ITIM) e quatro sítios para glicosilação (FINGER et al., 1997).

O gene *PDCDI* foi seqüenciado em cinco indivíduos não consangüíneos com lupus eritematoso sistêmico (LES) e em cinco indivíduos sadios e consangüíneos de pessoas com LES, detectando-se sete SNPs, denominados PD-1.1, PD-1.2, PD-1.3, PD-1.4, PD-1.9, PD-1.5, PD-1.6 por PROKUNINA et al. (2002). Entre os SNPs identificados, apenas o alelo A do SNP (PD-1.3) localizado no intron 4 (posição +7146) encontrava-se associado positivamente ao LES na amostra de europeus e mexicanos. Esta variante apresenta frequência alélica muito baixa em afro-americanos.

O SNP PD-1.3 está localizado no intron 4 de *PDCDI*, em uma região com estrutura semelhante a um intensificador pois contém sítios de ligação para os fatores transcricionais envolvidos exclusivamente na diferenciação hematopoética e na inflamação como RUNX1, fator de ligação E-box e fator nuclear κ de células B (NF κ B).

PROKUNINA et al. (2002) propuseram que o alelo comum (G) presente no intron 4 do gene *PDCDI* permite a ligação do fator transcricional RUNX1 e a subsequente modulação da transcrição deste gene. Durante a ativação celular com um auto-antígeno, o intensificador com a variante G levaria a um rápido aumento da expressão de *PDCDI*, o que promoveria a inibição de células T auto-reativas, preservando a tolerância ao próprio. A presença do alelo A interromperia o sítio de ligação no DNA para o fator RUNX1 e resultaria na diminuição da expressão de PD-1.

Vários estudos de associação demonstraram correlação entre as variantes de *PDCDI*, principalmente *PDCDI +7146A* ou PD1.3A, e doenças auto-imunes como SLE (PROKUNINA et al., 2002; SANGHERA et al., 2004), artrite reumatóide (PROKUNINA et al., 2004), diabetes tipo 1 (NIELSEN et al., 2003) e esclerose múltipla (KRONER et al., 2005). Nestes estudos, um dos fatores desencadeadores da doença corresponderia à variante A por contribuir com o decréscimo da expressão da molécula PD-1, que regula a inibição de células T, resultando em uma maior predisposição a estas doenças auto-imunes.

Estes achados de associação foram realizados em amostras de pacientes e controles procedentes de diferentes localidades: Suécia, Dinamarca, Estados Unidos (europeus-americanos e afro-americanos) e México e, em todos estes grupos, a frequência do alelo *+7146 A* nos pacientes era superior àquela observada nos controles.

Os genes dos receptores de PD-1, *PDL1* (ou *B7H1*) e *PD2L* (ou *B7DC*), estão localizados no braço curto do cromossomo 9 (9p24.2) muito próximos um do outro, sendo o gene *PD2L* mais centromérico que *PD1L*. Esta proximidade física, associada à interação com um receptor comum, sugere que estes genes tenham se originado de um evento de duplicação gênica com posterior diferenciação (TSENG et al., 2001). Para estes genes ainda não foram descritos polimorfismos.

3. Justificativas e Objetivos

Pênfigo foliáceo é uma doença auto-imune bolhosa caracterizada pela presença de auto-anticorpos contra estruturas protéicas de adesão celular da epiderme, culminando com a formação de bolhas acantolíticas superficiais na epiderme. A perda da barreira física cutânea pode resultar, ao portador desta doença, em um aumento na susceptibilidade a infecções e a um comprometimento da regulação térmica do organismo. O tratamento é apenas paliativo e demorado e é realizado com drogas que suprimem a resposta imune de modo sistêmico e que no decorrer do tratamento contra o pênfigo foliáceo, podem comprometer outras funções fisiológicas do indivíduo. A elucidação dos fatores que levam ao surgimento ou à manutenção da doença contribuirá para que a sua patogênese seja melhor compreendida e, com isso, que procedimentos mais eficazes e direcionados a bloquear o estabelecimento das lesões sejam desenvolvidos, minimizando os efeitos colaterais causados pelo tratamento com imunossuppressores generalizados.

O pênfigo foliáceo, como a maioria das doenças auto-imunes, é multifatorial e como tal não pode ser atribuída a um único gene ou a um único fator ambiental. O padrão poligênico de herança é uma forte motivação para a busca de genes de susceptibilidade. Além disso, a busca destes genes permitirá, no futuro, o emprego de estratégias profiláticas ou terapêuticas embasadas na modulação específica da resposta imune nos pacientes.

Dentre os genes da resposta imune estudados, as variantes dos genes *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1* apresentam uma associação bem caracterizada com a doença. Além destes, variantes alélicas de outros genes devem estar envolvidas na patogênese desta doença, entre as quais aquelas que codificam as citocinas. Os genes das citocinas são fortes candidatos para estudos de associação com PF, uma vez que seus produtos atuam como sinalizadores entre células, modulando a resposta imune. Além destes, os genes que codificam moléculas envolvidas na interação entre células T e células apresentadoras de antígeno (CAA) também são candidatos ao estudo de associação. Estas moléculas desempenham importante papel no estabelecimento da auto-tolerância periférica, na regulação da resposta imune e na integração dinâmica entre várias outras moléculas e células da resposta imune adaptativa.

Tendo em vista o panorama acima exposto, o presente trabalho tem como objetivo principal contribuir para uma linha de investigação, que visa testar a hipótese de que variantes

(isto é alelos e/ou haplótipos) de genes implicados na resposta imune sejam co-responsáveis por diferenças inter-individuais de susceptibilidade ao pênfigo foliáceo.

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Verificar se as variantes dos genes das citocinas IL-13 e IL-4 desempenham algum papel na suscetibilidade ao PF e para tanto serão investigadas:
 - Associações entre alelos e genótipos dos genes *IL13* e *IL4* e o PF.
 - Associações entre os haplótipos das variantes polimórficas dos genes *IL13* e *IL4* e o PF.
- Pesquisar se as variantes do gene *PDCD1* estão relacionadas com a suscetibilidade ao PF, através de:
 - Estudos de associação de alelos e genótipos de *PDCD1* com PF.
 - Estudos de associação entre os haplótipos das variantes polimórficas do gene *PDCD1* e PF.
- Determinar as freqüências das variantes de *PDCD1*, *IL13* e *IL4* nas amostras deste estudo, uma vez que não há dados sobre este polimorfismo para a população brasileira.
- Analisar a interação entre as variantes dos genes analisados neste estudo e a doença PF.
- Verificar se as variantes dos genes analisados em estudos anteriores, *HLA-DRB1*, *IL6*, *IL4*, *IL4R* e *DSG1* interagem com aquelas dos genes *PDCD1*, *IL13* e/ou *IL4* de modo a afetar a susceptibilidade ao PF.

4. Materiais e Métodos

4.1 Caracterização das amostras

As amostras deste estudo foram obtidas da coleta de sangue periférico de indivíduos com pênfigo foliáceo que estavam internados ou em consulta no Hospital Adventista do Pênfigo, em Campo Grande, MS. As amostras dos indivíduos-controle foram obtidas dos familiares não consangüíneos e/ou amigos dos pacientes, que os acompanhavam no momento da coleta e de funcionários do hospital que voluntariamente se candidatavam para participar do estudo.

As coletas de sangue foram realizadas por membros da equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR, em parceria com o Dr. Alfredo Marquart Filho, dermatologista daquele hospital, em cinco diferentes períodos: outubro de 1997, fevereiro de 1998, julho de 2001, julho de 2002 e fevereiro de 2004.

A amostra analisada neste estudo é constituída por 160 pacientes e 340 controles. Os pacientes foram diagnosticados como tendo PF através dos resultados de exames clínico e histopatológico.

A amostra de estudo foi subdividida em duas subamostras denominadas euro-brasileiros (EU) composta por 92 pacientes (26,0%) e 262 controles (74,0%) e afro-brasileiros (AF) formada por 68 pacientes (46,6%) e 78 controles (53,4%). A amostra de pacientes é constituída por euro-brasileiros (EU) (57,5%) e afro-brasileiros (AF) (42,5%). Dentre estes pacientes AF estão incluídos mulatos claros (18,8%), mulatos médios (15,0%) mulatos escuros (5,0%) e negros (3,7%). Entre os controles, 77,1%, são EU e 22,9% são AF, nos quais estão inseridos 12,6% de mulatos claros, 7,9% de mulatos médios, 1,2% de mulatos escuros e 1,2% negros.

A maioria dos pacientes reside no estado do Mato Grosso do Sul (78,0%), 3,8% no Mato Grosso, 3,8 % no Paraná, 3,1% em Minas Gerais, 1,8% no Paraguai, 1,3% em Rondônia, 1,3% no Espírito Santo, 1,3% em Goiás, 1,3% em São Paulo, 0,6% no Acre, 0,6% no Distrito Federal, e 0,6% na Bolívia. A informação sobre o local de residência não foi obtida para 2,5% dos pacientes.

Os indivíduos-controles são indivíduos sadios e que em sua maioria (57,9%) residiam nas áreas endêmicas da doença, sendo originários principalmente do Mato Grosso do Sul

(74,0%), do Paraná (21,0%), de Rondônia (1,5%), de Mato Grosso (1,5%), de São Paulo (1,0%), de Minas Gerais (0,5%) e de Santa Catarina (0,5%).

Além da escolha destes indivíduos-controle, que supostamente apresentavam possibilidades de exposição aos fatores ambientais (cônjuge de paciente e moradores da região endêmica) semelhantes às dos pacientes, foram também selecionados para o grupo controle, indivíduos provenientes da região metropolitana de Curitiba (42,1%) para aumentar o tamanho da amostra. A fim de verificar se essa segunda subamostra era adequada como controle, foram realizados testes de homogeneidade entre as duas subamostras.

Os indivíduos analisados neste estudo também foram classificados quanto à escolaridade em analfabetos, semi-analfabetos (escreve o nome), fundamental incompleto, fundamental completo, médio incompleto, médio completo, superior incompleto e superior completo. Entre os pacientes e controles, 73,8% e 41,2%, respectivamente, eram analfabetos ou semi-analfabetos ou não concluíram o ensino fundamental.

A proporção sexual entre os pacientes foi 48,8% de mulheres e 51,3% de homens; entre os controles, havia 54,4% de mulheres e 45,6% de homens.

A idade média dos pacientes por ocasião da averiguação foi de 42,7 com desvio padrão de 1,42 e idades mínima e máxima de 6 anos e 88 anos, respectivamente, e a idade média dos controles foi de 47,3, desvio padrão 1,09 e idades mínima e máxima de 12 anos e 86 anos, respectivamente.

Entre os pacientes, 25,0% relataram ter um ou mais consangüíneos com a mesma doença. Indivíduos contatados como possíveis controles foram excluídos da amostra, quando apresentassem um parente consangüíneo afetado por PF.

A idade média de manifestação da doença foi de 31,8, com desvio padrão de 1,29, com idade mínima de 2 anos e idade máxima de 82 anos. Quando manifestaram a doença, 68,8% dos pacientes residiam no estado do Mato Grosso do Sul, 9,4% em Mato Grosso, 5,6% no Paraná, 3,1% no Paraguai, 2,5% em Goiás, 2,5% em Minas Gerais, 1,9% em Rondônia, 1,9% em São Paulo, 1,3% Espírito Santo, 0,6% no Acre, 0,6% no Distrito Federal, 0,6% em Pernambuco e 0,6% no Tocantins e 0,6% dos pacientes não sabiam informar o local aonde ocorreram os primeiros sintomas da doença.

Devido a problemas técnicos ou à má qualidade de algumas amostras de DNA, o número de indivíduos analisados para as variantes de determinados genes diferiu dos números acima mencionados.

Todos os indivíduos incluídos neste estudo assinaram um termo de consentimento após terem recebido explicações sobre os objetivos da pesquisa e de responderem a um questionário (anexo 1) que continha informações relevantes para este estudo. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

4.2 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico e obtido através de dois procedimentos técnicos distintos. O DNA de uma parte da amostra foi isolado por um método de *salting-out*, que emprega o detergente NONIDET P-40 (LAHIRI e NURNBERGER, 1991) e as demais amostras pelo método do fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA das amostras dos pacientes e dos controles foi amplificado e analisado para os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) *IL13 -1111*, *IL13 +2044*, *IL13 +2525*, *PDCD1 +7146* (PD1.3), *PDCD1 +7785* (PD1.5) e *PDCD1 +8737* (PD1.6) e também para os genes *HLA-DQB1*, *HLA-DQA1* e *HLA-DRB1*. Para estes três genes *HLA* foram tipificadas subamostras de AF e EU, constituídas por 72 pacientes e 31 controles, uma vez que o restante da amostra já fora tipificada em estudos anteriores realizados pela equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR.

As reações de amplificação foram executadas no termociclador (PTC-200 MJ Research). Para cada PCR, foi inserido um controle negativo que visava detectar possíveis contaminações por DNA. Este controle continha no tubo de reação todos os reagentes da PCR, exceto o DNA genômico. Quando este controle apresentava-se contaminado, todos os produtos de PCR do ensaio em questão eram excluídos da análise.

As PCRs dos SNPs *IL13 +2525*, *PDCD1 +7785* (PD1.5) e *PDCD1 +8737* (PD1.6) foram realizadas em um volume final de 20µl, contendo: tampão 1X (obtido do tampão 10X constituído de Tris-HCl pH 8,3 10mM, KCl 50mM); dNTP 0,2mM cada; MgCl₂ 2,5mM; 6 pmoles de cada oligonucleotídeo-iniciador do gene *PDCD1* e 8 pmoles de cada iniciador para o gene *IL13*; 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen) para as variantes de *PDCD1* e 0,7U para as variantes de *IL13* e 0,06µg de DNA genômico. As condições da PCR empregadas para

amplificar o segmento do gene PD1.5 foram 35 ciclos de 95°C-15 seg, 67°C- 30 seg, 72°C-15 seg; para PD1.6 foram 35 ciclos de 95°C-15 seg, 68°C- 30 seg, 72°C-15 seg e para *IL13* foram 35 ciclos de 95°C-30 seg, 62°C- 30 seg, 72°C-15 seg.

Para os SNPs *IL13-1111*, *IL13+2044* e *PDCD1 +7146* (PD1.3) o protocolo de amplificação encontra-se na tabela 1.

Após as reações de amplificação era realizada uma eletroforese para controle da qualidade da PCR, aplicando-se 4 µl do produto de PCR em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% e submetendo à corrida eletroforética de 100V por 1 hora. O tampão TBE 0,5X (5,4g de Tris-HCl, 2,75g de ácido bórico, 2 ml de EDTA dissódico 0,5M pH 8,0 em quantidade suficiente de água para 1000 ml) foi usado tanto para o preparo dos géis quanto para a corrida eletroforética.

Após corrida eletroforética, o gel de agarose era corado por 20 minutos em uma solução de brometo de etídeo (5µl de brometo de etídeo 10mg/ml para cada 100ml de água). Os produtos de 295 pb, 568pb e 727pb correspondentes aos SNPs *IL13 +2525*, *PDCD1 +7785* (PD1.5) e *PDCD1 +8737* (PD1.6), respectivamente, foram visualizados no transiluminador de luz ultra-violeta e fotografados através de um sistema de fotodocumentação computadorizado.

O protocolo de amplificação do segundo exon dos genes *HLA-DQB1*, *DQA1* e *DRB1* está descrito no manual do 12º Workshop Internacional de Histocompatibilidade (BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA, 1997). Os produtos da PCR dos dois primeiros genes apresentam um tamanho de 214pb e 238pb, respectivamente.

A tipificação do gene *HLA-DRB1* foi realizada em duas etapas. Na primeira, foi feita uma amplificação considerada genérica e o produto da PCR (274pb) foi depois utilizado para a tipagem de baixa resolução pelo método de SSO. Este possibilita a classificação dos alelos em sete grandes grupos: *DR1*, *DR2*, *DR4*, *DR52*, *DR7*, *DR9* e *DR10*. Após identificação dos grupos alélicos procedeu-se a segunda etapa, na qual foram realizadas PCR grupo-específicas e cujos produtos apresentam tamanhos distintos (261 pb para os grupos *DR1* e *DR2*; 266 pb para *DR52* e *DR9*; 263 pb para *DR4*; 211 pb para *DR7* e 209 pb para *DR10*). Os produtos das PCRs grupo-específicas foram posteriormente utilizados para a tipagem de alta resolução, pelo método de SSO, o qual permite a tipificação em nível alélico.

TABELA 1. Protocolo para amplificação das regiões polimórficas dos genes *IL13* e *PDCD1*

Reagentes	<i>IL13-1111</i> Quantidade ou conc. no tubo de reação	<i>IL13+2044</i> Quantidade ou conc. no tubo de reação	<i>PDCD1+7146</i> Quantidade ou conc. no tubo de reação
Tampão 10X	1X	1X (sulfato)	1X
dNTPs 2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	3,0mM	1,5mM
Oligonucleotídeos iniciadores (cada 25µM)	8pmoles cada	8pmoles cada	8pmoles cada
Taq polimerase (Invitrogen) 5U/µl	0,7U	0,7U	1U
DNA genômico 20µg/ml	0,1µg	0,1µg	0,1µg
Água Ultra-pura	qsp 20µl	qsp 20µl	qsp 20µl
Ciclagens	35 ciclos 95°C- 30 seg 62°C- 30 seg 72°C- 15 seg	32 ciclos 95°C- 1 min 55°C- 1 min 72°C-1 min	35 ciclos 95°C- 15 seg 60°C- 30 seg 72°C- 15 seg

4.4 Tipificação das variantes dos genes *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DQA1*, *IL13* e *PDCD1* pelo método PCR-SSOP (*Polimerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probes*)

Após a amplificação, pela PCR, das extensões de DNA necessárias à análise dos genes *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DQA1*, *IL13 +2525*, *PDCD1 +7785* (PD1.5) e *PDCD1 +8737* (PD1.6) foi realizada a hibridação com oligonucleotídeos-sonda de seqüências específicas (SSOP), para genotipagem das amostras de pacientes e controles. A tabela 2 apresenta as seqüências dos oligonucleotídeos-iniciadores e das sondas usadas para identificar as variantes dos genes *IL13* e *PDCD1*, os quais foram projetados especialmente para este estudo. Os alelos dos genes *HLA-DQB1*, *DQA1* e *DRB1* foram analisados conforme o protocolo recomendado pelo 12º Workshop Internacional de Histocompatibilidade, sendo que as seqüências dos

oligonucleotídeos-iniciadores e das sondas bem como suas especificidades alélicas encontram-se nestes protocolos (BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA, 1997).

TABELA 2. Sequências dos oligonucleotídeos-iniciadores e sondas empregados para tipificação dos SNPs *IL13* +2525, *PDCD1* +7785 e *PDCD1* +8737 pelo método PCR-SSOP

Gene	Polimorfismo	Oligonucleotídeos-iniciadores	Sequências 5'→3'	Sequências 5'→3'dos Oligonucleotídeos sondas
<i>IL13</i>	+2525 (A,G)	IL13 3UTR F	cct tgc cag aca tgt ggt ggg a	SND1G: ggc tgc t G g cac ttg g
		IL13 3UTR R	tcg gat gag gct ccg agg cc	SND2A: gct A gc act tgg agc caa SND3AG: cag gca cac ttc ttc ttg gtc
<i>PDCD1</i>	+7785 (C,T)	PDCD1.5 ex5 F	cct gag cag acg gag tat gcc	SND1T: ggg get cag c T g acg
		PDCD1 microsat R	tgc tcc aag gcc atc tcc aac	SND2C: etc agc C ga cgg ccc SND3CT: gca ggg tgc agg cca
<i>PDCD1</i>	+8737 (G,A)	PDCD1 microsat F	cta cag gga ggg cca gat gca	SND1A: ccc ccc at A tgc cca
		PDCD1.6 3UTR REV	agc ccg gcc aac ccc ttt aaa	SND2G: cca t G t gcc cac cct SND3GA: cca ggc agc acc tca

Obs: em negrito e maiúsculo são demonstrados os SNPs identificados pelos oligonucleotídeos-sondas.

4.4.1 Marcação das sondas de *IL13* e *PDCD1* com digoxigenina

Cada reação de marcação foi realizada em um volume final de 25µl, contendo 2,5 pmol/l de oligonucleotídeo-sonda, 50 µM de Digoxigenina-11-ddUTP (Boehringer), tampão da enzima transferase terminal (NEB = New England Biolabs) e 0,8U da enzima transferase terminal (TdT-NEB). A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 37°C, sob agitação constante por 2 horas. As sondas marcadas foram estocadas a -70°C.

4.4.2 Marcação das sondas *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* com biotina

A maioria das sondas para tipificação dos genes *HLA* são procedentes dos Workshops Internacionais de Histocompatibilidade e já estavam marcadas com biotina. As demais foram marcadas de acordo com o seguinte protocolo: em um volume final de 25µl, contendo 2,5 pmol/ml de oligonucleotídeo-sonda, 0,04 mM de Biotina-14-dATP (Fermentas); tampão da enzima transferase terminal (NEB), 0,8U da enzima transferase terminal (TdT-New England

Biolabs) e 0,25 mM de CoCl_2 . A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 37°C, sob agitação constante, por 2 horas. As sondas marcadas foram estocadas a -70°C.

4.4.3 Confeção de *dot-blot*s para tipificação de *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *PDCD1 +7785* e *PDCD1 +8737* por PCR-SSOP

Foram aplicados 1,5µl dos produtos amplificados em membranas de náilon carregadas positivamente (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Após aplicação, as membranas foram imersas por 5 minutos em solução de NaOH 0,4N à temperatura ambiente, para desnaturação do DNA. Em seguida, as membranas foram neutralizadas em solução de SSPE 3x por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois de secas em estufa a 37°C, o DNA foi fixado à membrana através do uso do calor (80°C) por 2 horas.

4.4.4 Hibridação dos produtos de PCR dos genes *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* e *HLA-DQB1* com sondas marcadas com biotina

O protocolo de hibridação compreendeu as seguintes etapas, com as quantidades estipuladas para cada frasco (BIGNON e FERNADEZ-VIÑA, 1997):

Pré-hibridação: realizada a 48°C

- Hidratação das membranas com 10ml de solução de SSPE 4x por 10 minutos.
- Pré-hibridação em 7 ml de solução de TMAC (Tris-HCl pH 8,0 50mM; SDS 0,1%; EDTA dissódico pH 8,0 2mM; TMAC-cloreto de amônio tetrametilado, 3M) por 30 minutos.

Hibridação: realizada a 48°C

- Hibridação em solução de TMAC contendo 4nM de sonda biotilada por 2 a 3 horas.

Lavagem das membranas

- Lavagem de baixo rigor, para retirada do excesso de sonda com 10ml da solução A (SSPE 2x, SDS 0,1%), em duas etapas de 10 minutos a 37°C.
- Lavagem de alto rigor, para retirada das sondas não específicas que se ligaram ao DNA fixado na membrana, com 7 ml de solução de TMAC a 52°C durante 20 minutos exatos.

Revelação: realizada a 37°C

- Lavagem com 10ml de SSPE 3x, SDS 0,5% por 10 minutos.

- Adição do conjugado, HRP-SA na concentração de 0,5µg/ml em 10ml de SSPE 3x, SDS 0,5%, por 30 minutos.
- Lavagem com 10ml de SSPE 1X, SDS 0,1% por 10 minutos, por duas vezes, para retirada do excesso de conjugado.
- Acidificação da membrana com 5 ml de tampão citrato (citrato trissódico 0,1M, pH5,0 ajustado com ácido cítrico monohidratado) por 5 minutos.
- Reação colorimétrica em 5ml da solução [5ml de tampão citrato, 5µl de H₂O₂ e 150µl de solução de TMB (2mg/ml de H₂O)] após 5-10 minutos de reação no escuro.
- Interrupção da reação com uso de água bidestilada.

Leitura dos *Dot Blots*

- Os sinais obtidos eram interpretados por meio de escores de acordo com a sua intensidade: (1) negativo, (2) provavelmente negativo, (4) duvidoso, (6) positivo fraco, (8) positivo e (9) positivo com sinal muito forte.

4.4.5 Hibridação dos produtos de PCR dos genes *PDCD1 +7785* e *PDCD1 +8737* com sondas marcadas com digoxigenina

O protocolo de hibridação compreendeu as seguintes etapas (BIGNON e FERNADEZ-VIÑA,1997):

Pré-hibridação: realizada a 42°C

- Bloqueio das membranas em 10 ml de solução de SSPE4x, caseína 1% e laurilsarcosina 0,1% por 10 minutos.
- Pré-hibridação em 10ml de solução de TMAC por 30 minutos.

Hibridação: realizada a 42°C

- Hibridação em solução de TMAC contendo 10pmoles/µl de sonda marcada com digoxigenina durante 16 horas.

Lavagem das membranas

- Lavagem em 10 ml de TMAC durante 10 minutos a 52°C, por duas vezes.
- Lavagem em 10 ml de solução de Tris 0,1M pH 7,5 e NaCl 0,15M por 10 minutos a 37°C.

Revelação: realizada a 37°C

- Bloqueio das membranas em 10ml de caseína 1% (dissolvida em solução de Tris 0,1M pH 7,5 e NaCl 0,15 M) por 30 minutos.
- Incubação com 4µl de conjugado anti-DIG+AP (DIG Detection Kit, Boehringer) por 30 minutos.
- Lavagem em 10ml de solução de Tris 0,1M pH7,5 e NaCl 0,15 M durante 10 minutos, por duas vezes.
- Alcalinização da membrana em 5 ml de solução de NaCl 0,1M, MgCl₂ 50mM e Tris 0,1 M pH 9,5 por 5 minutos.
- Incubação da membrana em solução de Lumiphos por 15 minutos em BM a 37°C.
- Colocação da membrana úmida em filme transparente de PVC e acondicionamento da membrana com o filme de Raio X (Kodak) no cassete para exposição durante 30 minutos. Revelação dos filmes de raio-X, utilizando solução reveladora e fixadora da Kodak, segundo instruções do fabricante.

Leitura dos *Dot Blots*

- A leitura dos sinais evidenciados nos dot blots seguiu os mesmos critérios descritos no item 4.4.4.

4.4.6 Desibridação

Após a leitura das membranas, elas eram desibridadas para posterior utilização. A desibridação foi realizada mediante agitação das membranas em solução de NaOH 0,4N por 15 minutos a 42°C, e por mais 15 minutos, na mesma temperatura, na solução de Tris-HCl 0,2M pH 7,5; SDS 0,5%; SSPE 0,1x. As membranas cujas sondas eram marcadas com biotina eram descoloridas com solução de etanol 80% antes da desibridação.

4.5. Tipificação de SNPs pelo método da PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism*)

A tipificação de alguns SNPs presentes nos genes *IL13* e *PDCD1* foi realizada pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida da análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). Dentre alguns oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR, alguns foram projetados com substituição de bases que criaram falhas de pareamento em uma das posições com a seqüência-alvo genômica. Estas

substituições objetivavam criar sítios de restrição de endonucleases quando na presença de alelos específicos. A tabela 3 apresenta as seqüências dos oligonucleotídeos-iniciadores usados para amplificar os segmentos de DNA que incluem os polimorfismos *IL13 -1111*, *IL13 +2044* e *PDCD1 +7146* (PD1.3).

TABELA 3. Oligonucleotídeos-iniciadores usados na amplificação de regiões polimórficas dos genes das interleucinas e dos receptores para análise por PCR-RFLP

Gene	Nucleotídeo	Variantes Alélicas	Oligonucleotídeos-iniciadores	Seqüências 5' → 3'
<i>IL13</i>	-1111*	C, T	IL-13-1112Fw	gga atc cag cat gcc ttg tga gg
			IL-13-1112 Rev	gtc gcc ttt tcc tgc tct tcc <u>cGc</u>
<i>IL13</i>	+2044 [#]	G, A	IL-13ex4 Fw	tgg cgt tct act cac gtg ct
			IL-13ex4 Rev	ttt cga agt ttc agt <u>Gga</u> ac
<i>PDCD1</i> (PD1.3)	+7146**	G, A	PD-1.3 Fw	ccc cag gca gca acc tca at
			PD-1.3 Rev	gac cgc agg cag gca cat at

Obs: as bases com letra maiúscula e sublinhado foram intencionalmente substituídas para criar sítios de restrição para endonucleases. *iniciadores projetados segundo WANG et al. (2003); # iniciadores segundo NOGUCHI et al. (2001); ** iniciadores projetados por PROKUNINA et al. (2002).

A detecção dos SNPs dos genes *IL13* e *PDCD1*, por meio da análise dos fragmentos de restrição, foi realizada empregando-se 4µl do produto de PCR e 6µl da mistura das soluções para RFLP. Esta mistura continha solução tampão e a endonuclease de restrição (Fermentas) respectiva para cada gene analisado. A tabela 4 apresenta as endonucleases, as temperaturas e tempos de incubação utilizados para cada enzima e os fragmentos gerados após a clivagem com a enzima de restrição.

Os produtos de digestão (10µl) foram misturados com 2µl de corante azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 4%. A corrida eletroforética geralmente ocorria a 100V no tempo necessário para completa separação dos fragmentos gerados. Utilizava-se um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen) para facilitar a identificação dos fragmentos presentes em cada amostra. Após coloração em brometo de etídeo, os géis de agarose foram fotografados para análise do tamanho dos fragmentos.

TABELA 4. Endonucleases de restrição e fragmentos gerados após digestão dos produtos da PCR dos genes *IL13* e *PDCD1*

Gene	Nucleotídeo	Alelos	Fragmento amplificado (pb)	Endonuclease de Restrição, quantidade usada (U), tempo (h) e temperatura de incubação (°C)	Sítio de restrição 5'→3'	Fragmentos de Restrição (pb)
<i>IL13</i>	-1111	C, T	246	<i>FnuDII</i> ou <i>Bsh1236I</i> 0,3U 2h 37°C	CG↓CG cliva o alelo C	223 e 23
<i>IL13</i>	+2044	G, A	156	<i>NlaIV</i> 0,8U 2h 37°C	GGN↓NCC cliva o alelo G	138 e 18
<i>PDCD1</i> (PD1.3)	+7146	G, A	180	<i>PstI</i> 0,3U 2h 37°C	CTGCA↓G cliva o alelo A	130 e 50

Para genotipar as amostras dos indivíduos controles e pacientes quanto ao polimorfismo de PD1.5, foi realizada, além da PCR-SSOP, uma PCR-RFLP com digestão pela endonuclease de restrição *Pvu II* (LIN et al. 2004). O fragmento amplificado de 568pb ao ser submetido à incubação com 2U da enzima de restrição, por 2 horas a 37°C, foi clivado em dois fragmentos, 491pb e 77pb, quando na presença do alelo T. A PCR-RFLP serviu para confirmação dos resultados duvidosos obtidos pela PCR-SSOP.

4.6 Tipificação da repetição em tandem de número variável de *IL4*

VNTR (*variable number of tandem repeats*) é uma repetição em tandem de número variável localizada no intron 3 do gene *IL4*, cuja unidade de repetição tem 70 pares de bases.

Para esta tipagem foi realizada a técnica de PCR empregando-se os oligonucleotídeos-iniciadores projetados por WALLEY et al. (2001), *IL4VNTRFw* (5'gggTCAGTCTggCTACTgT 3') e *IL4VNTRRev* (5'CCCTACAACCgATCTgTCAg 3'), os quais delimitam a região de VNTR.

A quantidade de cada um destes iniciadores usada na reação de PCR com volume final de 20µl foi de 8 pmoles. A solução de reação continha ainda os seguintes reagentes: tampão sulfato 1X (obtido do tampão 10X constituído Tris-HCl pH 9,0 670mM, (NH₄)₂SO₄ 160mM, Tween 0,1% p/v), dNTP 0,2mM, MgCl₂ 3mM, Taq polimerase 0,7U e DNA genômico 0,2µg. As condições da PCR foram as seguintes: 35 ciclos de 94°C a 30 seg, 50°C a 30 seg e 72°C a 30 seg.

Após a reação de amplificação, 12 µl de produto de PCR foram aplicados no gel de agarose a 4% que foi submetido a uma corrida eletroforética a 100V por 3 horas para completa separação das bandas.

Com a eletroforese e posterior coloração pelo brometo de etídeo foi possível determinar o número de repetições de 70 pb presentes no intron 4 do gene *IL4*. Foi denominado de alelo 1 aquele que apresentava 3 repetições, perfazendo um fragmento de 342 pb; alelo 2, com 2 repetições e um total de 272 pb; alelo 3, com 4 repetições e um total de 412 pb; alelo 4, com apenas 1 repetição de 70 pb e um fragmento de 202 pb, sendo este o produto de PCR de menor tamanho (BUCHS et al., 2000).

4.7 Tipificação do microsatélite do gene *PDCDI*

O método utilizado para a tipificação de um microsatélite localizado no gene *PDCDI* foi a amplificação por meio de PCR, com oligonucleotídeos-iniciadores marcados com fluoróforos, seguida da separação dos fragmentos amplificados em gel desnaturante em aparelho seqüenciador MegaBace (Amersham). Os dados foram obtidos do seqüenciador e analisados com auxílio do programa computacional “Fragment Profiler” do MegaBace.

O microsatélite analisado é um trinucleotídeo CTG presente na região +8151 do exon 5 do gene *PDCDI*. Os oligonucleotídeos-iniciadores que demarcam este microsatélite foram projetados especialmente para este estudo, sendo eles o *PDCDI* micros Fwd (5'cta cag gga ggg cca gat gca 3'), marcado com o fluoróforo 6-FAM de fluorescência azul, e o *PDCDI* micros Ver (5'tgc tcc aag gcc atc tcc aac 3').

A amplificação deste microsatélite ocorreu por meio de uma reação multiplex com o microsatélite *D2S72* analisado em outro projeto do nosso laboratório, em um volume total de 20µl: tampão 1X (obtido do tampão 10X que contém: Tris-HCl pH 8,3 10mM, KCl 50mM); dNTP 0,2mM cada; MgCl₂ 2,5mM; 6 pmoles de cada oligonucleotídeo-iniciador do gene *PDCDI* e 8 pmoles de cada iniciador para *D2S72*; 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen) e

0,03µg de DNA genômico. As temperaturas e tempos empregados durante a PCR foram 35 ciclos de 95°C a 15 seg, 60°C a 30 seg e 72°C a 15 seg.

4.7.1 Preparo das amostras para eletroforese em gel desnaturante

Os produtos de PCR foram diluídos seguindo a proporção 1:5 em volume final de 10µL. Deste volume, 2,5 µL do produto amplificado diluído foi misturado com 3,5 µL de tampão de carregamento/padrão [2,2 µl de formamida deionizada + 0,43 µl de dextran blue (50mg/ml em EDTA 25mM) + 0,87 µl de GS-350 ROX]. Este padrão permite a determinação precisa do tamanho de fragmento de DNA na faixa de 50 a 350 bases. A seguir as amostras foram desnaturadas no termociclador, a 94°C por três minutos, e colocadas imediatamente sobre gelo até o momento de aplicação nas cavidades do gel.

4.7.2 Eletroforese em gel desnaturante

O gel desnaturante foi preparado com 18g de uréia, 27 ml de água bidestilada, 5ml de solução LongRanger 50% (Cambrex Bio Science) e 2,5 g de resina. Após polimerização do gel foi realizada uma pré-corrida de 20 minutos e logo após, 2 µl de cada amostra foram aplicados em cada cavidade do gel e deu-se início à corrida eletroforética de 2 horas.

4.7.3 Análise e interpretação dos dados

A designação dos alelos foi baseada no número de pares de bases. O intervalo de variação de tamanho dos alelos de *PDCDI* foi de 169 a 231pb.

4.8 Análise Estatística

As freqüências alélicas foram obtidas através da fórmula: $f_{al} = n/2N$, onde as freqüências relativa e absoluta do alelo são representadas por f_{al} e n , respectivamente e o número de indivíduos da amostra é N .

As freqüências genótípicas foram obtidas por contagem direta empregando-se o programa CONVERT 1.1 (PROBST, 1998). Este programa é auxiliar para a utilização de um pacote de programas ARLEQUIN versão 3.0 (EXCOFFIER, LAVAL e SCHNEIDER, 2005) que permitiu o cálculo das freqüências haplotípicas e do desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados. Utilizando ainda o pacote estatístico ARLEQUIN, as freqüências genótípicas obtidas foram comparadas com as esperadas segundo o teorema de Hardy-Weinberg através do método de GUO e THOMPSON, (1992). As estimativas das freqüências haplotípicas foram obtidas pelo método de máxima verossimilhança, utilizando-se o algoritmo EM (maximização da expectativa).

A análise de desequilíbrio foi realizada para os alelos pertencentes ao mesmo loco gênico ou ao mesmo cromossomo. O valor de desequilíbrio é obtido pela fórmula:

$$\Delta_{ab} = P_{ab} - p_a p_b \text{ onde:}$$

- Δ_{ab} : valor do desequilíbrio de ligação
- P_{ab} : freqüência estimada do haplótipo **ab**, na população analisada
- $p_a p_b$: freqüência esperada do haplótipo **ab**, calculada com base na freqüência observada do alelo (**a**) de um dado loco e da freqüência observada do alelo (**b**) de um outro loco

No entanto, um valor relativo do desequilíbrio de ligação (Δ'_{ab}) é mais informativo do que aquele descrito na fórmula acima, pois o Δ'_{ab} traz informação a respeito da magnitude do desequilíbrio de ligação em relação ao maior valor que ele poderia assumir, dadas as freqüências dos alelos em questão (LEWONTIN, 1964). Este valor relativo foi calculado pelo programa ARLEQUIN através da fórmula:

$$\Delta'_{ab} = \Delta_{ab} / \Delta_{ab, \text{máx}}$$

- onde o valor de $\Delta_{ab, \text{máx}}$ pode ter um dos dois valores:
- $\max [p_a p_b, (1 - p_a)(1 - p_b)]$, se $\Delta_{ab} < 0$ ou
- $\min [(1 - p_a)p_b, p_a (1 - p_b)]$, se $\Delta_{ab} \geq 0$

A significância estatística das diferenças das freqüências genótípicas, alélicas e haplotípicas, observadas entre pacientes e controles, entre os sub-grupos afro e euro-brasileiros de pacientes e de controles e também entre as duas subamostras de controles foi

estimada pela análise das tabelas de contingência 2x2. O valor de P foi determinado pelo teste exato de Fisher, implementado pelo algoritmo metropolis, com o auxílio do programa de computação RxC (MILLER, 2005). O valor de P igual a 0,05 foi adotado como limiar de significância para todos os testes estatísticos realizados.

A OR (razão de chances ou *Odds Ratio*) foi calculada através da fórmula $OR = (A \times D) / (B \times C)$ (WOOLF, 1955), sendo A, B, C e D as frequências absolutas de indivíduos obtidas de uma tabela de contingência 2x2, como a demonstrada a seguir:

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

O valor de OR exprime quantas vezes a doença é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator comparando com indivíduos sem o fator. Sempre que o valor de alguma célula (A, B, C ou D) era zero, realizava-se a correção de Haldane, segundo a fórmula:

$OR = [(A+0,5) \times (D+0,5) / (B+0,5) \times (C+0,5)]$. Valores de OR iguais a 1 sugerem que o fator analisado não está associado ao caráter em questão; valores superiores a 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a doença; valores abaixo de 1, a uma menor probabilidade.

O intervalo de confiança de 95% empregado nas determinações de OR foi obtido pelo método de WOOLF (1955) através da seguinte fórmula:

$$CI(95\%) = \text{anti ln} \left(\ln(OR) \pm 1,96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}} \right)$$

Realizamos análise de regressão logística múltipla para determinar as interações gênicas na amostra total (EU + AF) de pacientes e controles. Na regressão logística foi considerada variável dependente a presença ou ausência de PF e as variáveis independentes testadas foram os genótipos dos SNPs *IL13 -1111(C,T)*, *IL13 +2044(G,A)*, *IL13 +2525(G,A)*, *PDCD1 +7146(G,A)* ou PD1.3, *PDCD1 +7785 (C,T)* ou PD1.5, além dos genótipos dos SNPs de *IL6 -174(G,C)*, *IL4 -590(C,T)*, *IL4R +148(A,G)* e dos fenótipos do gene *HLA-DRB1*

(susceptível, protetor e neutro) obtidos dos estudos anteriores (PEREIRA et al., 2004 e PAVONI et al., 2003, respectivamente). No estudo de PAVONI et al. (2003), foi constatado que certos alelos de *HLA-DRB1* conferiam susceptibilidade (*01 e *04) ao PF e outros conferiam proteção (*07, *08, *11, *0301) e que os demais alelos de *DRB1* (*0302, *09, *10, *12, *13, *14, *15 e *16) apresentavam efeito neutro. No presente trabalho, incrementamos o tamanho amostral com novas tipificações para este gene e em conjunto com resultados obtidos por PAVONI et al. (2003), estabelecemos a classificação dos fenótipos em função dos valores de OR obtidos (tabela 5). Esta classificação foi empregada na análise de regressão logística.

Também utilizamos os dados obtidos no estudo de PETZL-ERLER e MALHEIROS (2005), que analisaram associação de PF com os SNPs do gene do autoantígeno *DSG1 +809(C,T)* e *DSG1 +1660(A,C)*.

Na regressão logística assumimos um modelo de epistasia. Para este modelo os genótipos foram categorizados em 2, 1 e zero, conforme os valores de OR obtidos nas análises genotípicas de cada gene individualmente: ao genótipo homocigoto com maior valor de OR foi atribuído o valor 2, ao heterocigoto, o valor 1, e ao outro homocigoto, foi atribuído o valor zero, segundo o modelo proposto por BUGAWAN et al. (2003).

TABELA 5. Codificação dos fenótipos do gene *HLA-DRB1* para análise de regressão logística

Valores para regressão logística	Genótipo observado	Fenótipo
0	P/P	Protetor
	P/N	
1	P/S	Neutro
	N/N	
2	S/S	Susceptível
	S/N	

S = susceptibilidade; N = neutro; P = proteção.

Anteriormente ao teste de regressão logística foi realizado um teste de associação para verificar a independência entre estas variáveis. Para tanto, empregou-se um teste de qui-quadrado contido no pacote estatístico SPSS®, versão 11.0. Na ausência de dependência entre as variáveis, cada uma delas foi analisada individualmente na regressão logística como variável independente e foram mantidas no modelo quando o valor de P era $< 0,25$, conforme HOSMER e LEMESHOW (1989). Todas as interações de segunda ordem entre estas variáveis foram selecionadas para inserção no modelo após a realização do procedimento condicional manual, em que cada análise era processada com apenas um termo de interação. O modelo final selecionado foi aquele que se apresentou mais ajustado conforme o teste de HOSMER e LEMESHOW (1989) presente no pacote estatístico SPSS versão 11.0. Para aquelas interações gênicas que se mostrassem significativas na análise de regressão, foram realizadas análises estratificadas para identificar a associação primária.

A fórmula de regressão logística (KLEINBAUM, 1994) é:

$$P(M^+/X_1, X_2, \dots, X_p) = [1 + \exp\{- (\alpha + \sum \beta_i X_i)\}]^{-1}, \text{ onde:}$$

$P(M^+/X_1, X_2, \dots, X_p)$ é a probabilidade de ser doente conhecendo as covariáveis X_1 a X_p ;

- α representa a constante da análise de regressão, e
- β_i é o coeficiente relativo a cada uma das covariáveis da análise.

O teste analisa se β_i é significativamente diferente de zero. A expressão $\exp\{\beta_i\}$ representa o *odds ratio*, associado à covariável X_i . Esta expressão mede o grau de associação entre os genótipos de um determinado gene e a doença. A variável significativa ($P < 0,05$) foi considerada fator de risco para a doença, quando β_i foi positivo. Quando β_i foi negativo, a variável foi considerada como protetora em relação à doença. O pacote estatístico SPSS® versão 11.0 foi usado para as análises de regressão logística.

5. Resultados

5.1. Análise do gene *IL13*

As subamostras EU e AF de pacientes e de controles são homogêneas quanto à distribuição das frequências alélicas dos três SNPs analisados do gene *IL13*. No teste de homogeneidade entre pacientes EU e pacientes AF para o SNP *IL13 -1111* (C,T) o valor de P foi 0,792 e entre os controles EU e AF o valor de P foi 0,355. Para os SNP *IL13 +2044* (G,A) e *IL13 +2525* (G,A) estes valores foram $P = 0,807$ e $P = 0,489$ para os pacientes, respectivamente, e $P = 0,821$ e $P = 1,000$, para os controles, respectivamente.

As frequências genóticas do SNP *IL13 -1111* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) nas subamostras EU e AF e nas amostras totais de controles, assim como em AF e na amostra total de pacientes, com exceção da subamostra EU de pacientes, na qual observamos $P = 0,042$ (tabela 6). Foi verificada a possibilidade de erros de tipagem, que fora realizada pela técnica de PCR-RFLP. Para esse RFLP, porém, houve concordância em 100% com os controles cegos ($n = 30$) analisados conjuntamente com as amostras de pacientes e controles. As frequências genóticas de *IL13 + 2044* e *+2525* encontram-se em equilíbrio de HW também nos pacientes e controles das subamostras de EU e de AF, estando os respectivos valores de P nas tabelas 7 e 8.

Não existem diferenças significativas quanto à distribuição das frequências alélicas, genóticas e de portadores dos alelos dos SNPs *IL13 -1111* (C,T), *IL13 +2044* (G,A) e *IL13 +2525* (G,A) entre os pacientes e controles nas subamostras EU e AF e na amostra total. A análise destas variantes do gene *IL13* não demonstra a presença de associação positiva ou negativa com PF (tabelas 6, 7 e 8). Quando analisamos os haplótipos (tabela 9) considerando as duas posições (*IL13 -1111_ IL13 +2525*), observamos uma frequência mais elevada do haplótipo TG no grupo de pacientes da subamostra EU quando comparada à do respectivo grupo controle (OR = 1,97). Para as demais combinações de três e de duas posições polimórficas analisadas nenhum dos haplótipos encontra-se associado positiva ou negativamente com PF (tabela 9).

Foram realizadas as estimativas de desequilíbrio de ligação entre os pares dos SNPs *IL13 -1111* (C,T), *IL13 +2044* (G,A) e *IL13 +2525* (G,A) para os pacientes e controles da

amostra total e das subamostras EU e AF (tabela 10). Nos controles AF não ocorre desequilíbrio de ligação entre os SNPs *IL13 -1111_IL13 +2044* e *IL13 -1111_IL13 +2525*, enquanto este fenômeno é observado nos controles EU e nos da amostra total. Ainda com respeito aos SNPs *IL13 -1111_IL13 +2044*, o desequilíbrio de ligação faz-se presente nos pacientes EU, AF e nos da amostra total; e quanto aos SNPs *IL13 -1111_IL13 +2525*, observa-se um desequilíbrio de ligação mais fraco nos pacientes AF e nos da amostra total, porém, a ausência do mesmo na subamostra de pacientes EU. Evidencia-se um forte desequilíbrio de ligação entre os SNPs *IL13 +2044_IL13 +2525* tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle da amostra total e de ambas subamostras.

TABELA 6. Comparação das frequências (%) alélicas, genotípicas e de portadores das variantes do SNP *IL13 -1111*(C,T) entre pacientes com PF e controles

Frequências	pacientes n=153	Total controles n=286	OR	IC 95%	P	Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
						pacientes n=88	controles n=223	OR	IC 95%	P	pacientes n=65	controles n=63	OR	IC 95%	P
Portadores															
-1111 C	90,8	93,4	0,70	0,34-1,45	0,352	89,8	92,8	0,67	0,29-1,60	0,359	92,3	95,2	0,60	0,14-2,62	0,720
-1111 T	401,2	42,0	0,95	0,63-1,41	0,832	38,6	39,5	0,97	0,58-1,60	1,000	44,6	50,8	0,69	0,35-1,38	0,583
Alélicas															
-1111 C	74,8	75,7	0,97	0,70-1,34	0,869	75,6	76,7	0,94	0,63-1,41	0,767	72,2	73,9	1,09	0,63-1,89	0,776
-1111 T	25,2	24,3	1,03	0,75-1,43		24,4	23,3	1,06	0,71-1,60		27,8	26,1	0,92	0,53-1,60	
Genotípicas															
C/C	58,8	58,0	1,00			61,4	60,5	1,00			55,4	49,2	1,00		
C/T	32,0	35,3	0,89	0,58-1,37	0,660	28,4	32,2	0,87	0,50-1,51	0,671	36,9	46,0	0,71	0,35-1,47	0,458
T/T	9,2	6,7	1,36	0,65-2,84	0,447	10,2	7,3	1,41	0,59-3,38	0,488	7,7	4,8	1,44	0,32-6,50	0,719
Hardy-Weinberg (P)															
	0,087	0,514				0,042	0,142				0,748	0,352			

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; P = probabilidade.

TABELA 7. Comparação das frequências (%) alélicas, genótípicas e de portadores das variantes do SNP *IL13 +2044(G,A)* entre pacientes com PF e controles

Frequências	Pacientes n= 159	Total controles n=325	OR	IC 95%	<i>P</i>	Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
						pacientes n=90	controles n=254	OR	IC 95%	<i>P</i>	pacientes n=69	controles n=71	OR	IC 95%	<i>P</i>
Portadores															
+2044 G	91,8	91,7	1,02	0,51-2,04	1,000	92,2	92,1	1,01	0,41-2,48	1,000	91,3	90,1	1,15	0,37-3,61	1,000
+2044 A	45,3	46,1	0,97	0,66-1,42	0,924	44,4	44,5	1,00	0,62-1,62	1,000	46,4	49,3	0,89	0,46-1,73	0,742
Alélicas															
+2044 G	73,3	73,1	1,03	0,76-1,39		73,9	73,8	1,00	0,68-1,48		72,5	70,4	1,11	0,66-1,86	
+2044 A	26,7	26,9	0,97	0,72-1,32	0,876	26,1	26,2	1,00	0,68-1,48	1,000	27,5	29,6	0,90	0,54-1,52	0,778
Genótípicas															
A/A	8,2	8,3	1,00			7,8	7,9	1,00			8,7	9,9	1,00		
A/G	37,1	37,2	1,01	0,49-2,10	1,000	36,7	36,6	1,01	0,39-2,62	1,000	37,7	39,4	1,00	0,32-3,65	1,000
G/G	54,7	54,5	1,02	0,50-2,08	1,000	55,6	55,5	1,01	0,40-2,54	1,000	53,6	50,7	1,00	0,37-3,91	1,000
Hardy-Weinberg (<i>P</i>)															
	0,546	0,317				0,593	0,411				0,762	0,774			

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; *P* = probabilidade.

TABELA 8. Comparação das frequências (%) alélicas, genotípicas e de portadores das variantes do SNP *IL13* +2525(G,A) entre pacientes com PF e controles

Frequências	Total					Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
	pacientes n= 128	controles n=228	OR	IC 95%	<i>P</i>	pacientes n=73	controles n=177	OR	IC 95%	<i>P</i>	pacientes n=55	controles n=51	OR	IC 95%	<i>P</i>
Portadores															
+2525G	93,0	93,4	0,92	0,39-2,16	0,827	91,8	93,2	0,81	0,29-2,25	0,788	94,6	94,1	1,08	0,21-5,63	1,000
+2525 A	46,9	49,1	0,92	0,60-1,42	0,737	49,3	49,2	1,01	0,58-1,74	1,000	43,6	49,0	0,81	0,37-1,73	0,699
Alélicas															
+2525 G	73,0	72,1	1,04	0,74-1,47		71,2	72,0	0,96	0,63-1,47		75,4	72,6	1,16	0,63-2,15	
+2525 A	27,0	27,9	0,96	0,68-1,36	0,858	28,8	28,0	1,04	0,68-1,59	0,915	24,6	27,5	0,86	0,47-1,59	0,631
Genotípicas															
G/G	53,1	50,9	1,00			50,7	50,9	1,00			56,4	51,0	1,00		
A/G	39,8	42,5	0,90	0,57-1,41	0,667	41,1	42,3	0,97	0,55-1,72	1,000	38,1	43,1	0,80	0,36-1,77	0,683
A/A	7,0	6,5	1,02	0,42-2,47	1,000	8,2	6,8	1,23	0,42-3,48	0,783	5,5	5,9	0,84	0,16-4,51	1,000
Hardy-Weinberg (<i>P</i>)															
	1,000	0,403				0,647	0,576				1,000	0,731			

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; *P* = probabilidade

TABELA 9. Comparação das frequências haplotípicas (%) do gene *IL13* entre pacientes com PF e controles

Haplótipos			Pacientes n=122	Controles n=210	Total			Pacientes n=71	Euro-Brasileiros			Pacientes n=52	Afro-Brasileiros			P	
IL13 +2044	IL13- 1111	IL13 +2525			OR	IC 95%	P		Controles n=163	OR	IC 95%		P	Controles n=47	OR		IC 95%
A	C	A	10,3	12,4	0,82	0,49-1,35	0,458	11,5	11,5	1,00	0,61-1,65	1,000	8,7	16,3	0,49	0,21-1,18	0,129
A	C	G	4,1	3,7	1,11	0,49-2,51	0,834	3,8	3,2	1,21	0,51-2,89	0,652	4,4	4,2	1,07	0,27-4,25	1,000
A	T	A	10,7	9,9	1,09	0,65-1,83	0,787	10,0	11,2	0,88	0,52-1,48	0,594	11,3	4,8	2,52	0,82-7,77	0,072
A	T	G	2,0	2,9	ND	ND	ND	2,2	3,0	ND	ND	ND	2,5	2,3	ND	ND	ND
G	C	A	4,8	4,9	0,98	0,47-2,04	1,000	6,0	5,9	1,02	0,52-2,00	1,000	3,1	0	6,90	0,36-134	0,252
G	C	G	54,1	55,6	0,94	0,68-1,29	0,678	50,5	57,7	0,75	0,54-1,03	0,082	58,8	49,7	1,45	0,83-2,54	0,266
G	T	G	14,0	10,1	1,45	0,90-2,35	0,139	16,0	7,5	2,34	1,39-3,93	0,082	11,2	19,3	0,52	0,24-1,16	0,172
G	T	A	0	0,5	ND	ND	ND	0	0	---	----	----	0	3,4	ND	ND	ND
IL13 +2044		IL13 +2525	n=126	n=224	OR	IC 95%	P	n=72	n=173	OR	IC 95%	P	n=55	n=51	OR	IC 95%	P
A		A	21,1	22,3	0,93	0,64-1,35	0,693	21,0	22,2	0,94	0,58-1,51	0,815	20,7	23,2	0,86	0,45-1,65	0,741
A		G	5,9	6,2	0,95	0,50-1,82	1,000	6,0	5,8	1,02	0,45-2,33	0,834	6,6	6,2	1,08	0,36-3,25	1,000
G		A	5,5	5,5	1,00	0,51-1,96	1,000	6,7	5,8	1,15	0,52-2,55	0,678	3,9	4,2	0,92	0,24-3,62	1,000
G		G	67,5	66,0	1,07	0,77-1,49	0,683	66,3	66,1	1,01	0,67-1,52	1,000	68,8	66,4	1,12	0,63-1,99	0,771
IL13 +2044	IL13 -1111		n=151	n=283	OR	IC 95%	P	n=87	n=222	OR	IC 95%	P	n=65	n=63	OR	IC 95%	P
A	C		13,4	14,8	0,89	0,60-1,34	0,696	13,7	12,5	1,11	0,66-1,86	0,693	13,0	21,9	0,54	0,28-1,04	0,067
A	T		12,7	13,5	0,93	0,62-1,42	0,746	12,2	15,0	0,79	0,47-1,33	0,368	13,9	8,3	1,78	0,80-3,97	0,162
G	C		61,4	60,8	1,02	0,77-1,36	0,939	61,6	64,1	0,90	0,63-1,29	0,589	60,9	50,3	1,53	0,93-2,51	0,127
G	T		12,5	10,90	1,16	0,75-1,79	0,497	12,5	8,4	1,56	0,89-2,73	0,126	12,2	19,5	0,58	0,29-1,15	0,164
	IL13 -1111	IL13 +2525	n=123	n=212	OR	IC 95%	P	n=72	n=164	OR	IC 95%	P	n=52	n=47	OR	IC 95%	P
	C	A	16,2	17,0	0,95	0,62-1,45	0,830	19,2	17,1	1,15	0,70-1,91	0,602	12,0	18,2	0,62	0,28-1,32	0,328
	C	G	57,4	59,7	0,91	0,66-1,25	0,567	53,1	61,3	0,71	0,48-1,06	0,073	63,0	52,0	1,56	0,89-2,76	0,140
	T	A	10,2	10,6	0,95	0,57-1,60	0,890	9,3	11,3	0,80	0,42-1,55	0,512	11,0	6,3	1,84	0,65-5,18	0,323
	T	G	16,2	12,7	1,33	0,85-2,07	0,209	18,5	10,3	1,97	1,13-3,41	0,017	14,0	23,5	0,53	0,26-1,10	0,140

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; P = probabilidade; ND = não determinado.

TABELA 10: Valores de desequilíbrio de ligação relativo (Δ') entre os SNPs do gene *IL13* nos pacientes e controles das subamostras de EU e AF e da amostra total

Controles	<i>IL13 +2044</i>			<i>IL13 +2525</i>		
	Total n=210	EU n=163	AF n=47	Total n= 210	EU n=163	AF n=47
<i>IL13 -1111</i>	0,3693 ^a	0,5121 ^a	0,0962 ^c	0,2362 ^a	0,3199 ^a	0,0711 ^c
<i>IL13 +2044</i>				0,7239 ^a	0,7129 ^a	0,8197 ^a
Pacientes	<i>IL13 +2044</i>			<i>IL13 +2525</i>		
	Total n= 123	EU n=71	AF n=52	Total n= 123	EU n=71	AF n=52
<i>IL13 -1111</i>	0,2830 ^a	0,2185 ^a	0,3918 ^a	0,1994 ^b	0,1119 ^c	0,3247 ^b
<i>IL13 +2044</i>				0,7389 ^a	0,6995 ^a	0,8289 ^a

Valor de desequilíbrio a: $P < 0,001$; b: $0,05 > P > 0,001$; c: $P > 0,05$;
 EU: Euro-brasileiros; AF: Afro-brasileiros

5.2. Análise do gene *IL4* e dos haplótipos dos genes *IL4* e *IL13*

As subamostras de EU e AF de pacientes apresentaram homogeneidade quanto à distribuição das frequências alélicas de *IL4 VNTR* ($P = 0,801$). Entretanto, as subamostras de controles EU e AF não eram homogêneas quanto a esta distribuição ($P = 0,025$). Assim, os resultados obtidos para o polimorfismo *IL4 VNTR* não foram empregados na análise de regressão logística.

Verificamos a ocorrência de quatro alelos, denominados 1, 2, 3 e 4, que apresentam 3, 2, 4 e 1 repetições de 70pb, respectivamente (tabela 11). Nos estudos anteriores (ARAI et al., 1989; BUCHS et al., 2000; WALLEY et al., 2001) não foi observada a variante com apenas uma unidade de repetição de 70pb, com um tamanho de fragmento de 197pb. Esta variante foi designada por nosso laboratório como alelo 4.

As frequências genóticas das duas subamostras de pacientes e controles estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 11).

A frequência dos portadores do alelo 1 é significativamente menor na subamostra EU de pacientes do que nos seus controles ($OR = 0,27$), o mesmo sendo observado na subamostra AF ($OR = 0,34$). A frequência dos portadores do alelo 2 é significativamente maior nos pacientes do que nos controles da subamostra EU ($OR = 2,45$), porém não foram observadas diferenças significativas nas frequências dos portadores deste alelo entre pacientes e controles da subamostra AF (tabela 11).

A investigação das frequências alélicas do VNTR de *IL4* demonstra que há diferenças significativas entre as frequências do alelo 2, que é maior na subamostra EU de pacientes do que nos seus controles ($OR = 2,15$). Quanto ao alelo 1, observa-se menor frequência nos pacientes EU quando comparados aos seus controles ($OR = 0,47$). Estas diferenças de frequência não foram estatisticamente significativas na subamostra AF de pacientes e controles.

Observamos na subamostra de EU, associação positiva entre os genótipos 2/2 e 1/2 de *IL4* e PF ($OR = 5,20$ e $OR = 2,11$, respectivamente).

No presente estudo, analisamos os haplótipos de *IL4*. O SNP *IL4 -590* foi tipificado anteriormente por PEREIRA et al., (2004) e os valores de frequências alélicas e genóticas do referido SNP foram transcritos na tabela 11. As informações deste polimorfismo foram empregadas no presente trabalho para a obtenção dos haplótipos constituídos pelas variantes da posição -590 e as do VNTR do gene *IL4*. Encontramos na subamostra de EU associações

positivas com os haplótipos T2 (OR = 1,89) e T1 (OR = 2,40). O haplótipo C1 está associado negativamente com a doença em EU (OR = 0,44). Em AF, as frequências haplotípicas não diferiram, de forma significativa, entre pacientes e controles (tabela 11). Estes resultados demonstram que o alelo 1 e o haplótipo C1 estão relacionados a uma menor susceptibilidade ao PF, enquanto o alelo 2, os genótipos 1/2 e 2/2 e os haplótipos T1 e T2 são marcadores de susceptibilidade aumentada em EU.

TABELA 11. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências (%) alélicas, genotípicas, haplotípicas e de portadores das variantes do polimorfismo *IL4 VNTR* (1,2,3,4) e do haplótipo *IL4 -590 (C,T)* e VNTR (1,2,3,4)

Frequências	Total#					Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
	Pac	Cont	OR	IC 95%	P	Pac n=78	Cont n=233	OR	IC 95%	P	Pac n=54	Cont n=68	OR	IC95%	P
Portadores															
1	ND	ND				85,9	95,7	0,27	0,11-0,67	0,007	77,78	91,18	0,34	0,12-0,97	0,044
2	ND	ND				62,8	40,8	2,45	1,45-4,16	0,001	57,41	63,24	0,78	0,38-1,63	0,586
3	ND	ND				0	0	----	----	----	1,85	0	ND	ND	ND
4	ND	ND				0	0,4	ND	ND	ND	1,85	1,47	ND	ND	ND
Alélicas															
1	ND	ND				61,5	77,3	0,47	0,32-0,69	4 x 10⁻⁴	59,3	63,3	0,85	0,50-1,42	0,617
2	ND	ND				38,5	22,5	2,15	1,46-3,17	4 x 10⁻⁴	38,9	36,0	1,13	0,67-1,90	0,687
3	ND	ND				0	0	ND	ND	ND	0,9	0	ND	ND	ND
4	ND	ND				0	0,2	ND	ND	ND	0,9	0,7	ND	ND	ND
Genotípicas															
1/1	ND	ND				37,2	58,8	1,00			40,6	35,3	1,00		
1/2	ND	ND				48,7	36,5	2,11	1,21-3,67	0,013	35,2	54,4	0,56	0,25-1,25	0,164
1/4	ND	ND				0	0,4	ND	ND	ND	1,9	1,5	ND	ND	ND
2/3	ND	ND				0	0	ND	ND	ND	1,9	0	ND	ND	ND
2/2	ND	ND				14,1	4,3	5,20	2,02-13,38	9 x 10⁻⁴	20,4	8,8	2,00	0,63-6,32	0,270
Hardy-Weinberg (P)															
Alélicas *	n=150	n=160	OR	IC 95%	P	n= 80	n=119	OR	IC 95%	P	n= 62	n=61	OR	IC 95%	P
-590C	58,0	67,5	0,66	0,48-0,92	0,014	63,1	73,5	0,62	0,40-0,95	0,037	55,7	59,8	0,84	0,51-1,40	0,528
-590T	42,0	32,5	1,50	1,08-2,09	0,013	36,9	26,5	1,62	1,05-2,50	0,036	44,3	40,2	1,19	0,72-1,97	0,524
Genotípicas *															
C/C	35,3	43,1	1,00			37,5	54,6	1,00			37,1	29,5	1,00		
C/T	45,3	48,8	1,13	0,70-1,84	0,608	51,3	37,8	1,97	1,08-3,62	0,035	37,1	60,7	0,49	0,22-1,09	0,098
T/T	19,3	8,1	2,90	1,38-6,12	0,008	11,3	7,6	2,17	0,78-6,01	0,168	25,8	9,8	2,09	0,68-6,41	0,277
Haplotípicas															
<i>IL4-590(C/T)VNTR</i> (1,2, 3)			OR	IC 95%	P	n=77	n=108	OR	IC 95%	P	n=52	n=54	OR	IC 95%	P
C1	ND	ND				53,0	72,2	0,44	0,28-0,68	3 x 10⁻⁴	49,9	57,3	0,74	0,43-1,28	0,355
C2	ND	ND				2,9	1,4	ND	ND	ND	2,1	1,1	ND	ND	ND
T1	ND	ND				8,7	3,8	2,40	0,97-5,93	0,018	8,8	10,3	0,84	0,33-2,11	0,817
T2	ND	ND				35,4	22,6	1,89	1,20-2,99	0,007	38,2	31,3	1,36	0,77-2,40	0,313
T3	ND	ND				0	0	----	----	----	1,0	0	ND	ND	ND

a amostra total não foi analisada para *IL4 VNTR* devido a heterogeneidade entre as amostras de euro-brasileiros e de afro-brasileiros *valores de frequências do SNP *IL4 -590* obtidos por PEREIRA et al., (2004). Pac = pacientes; Cont = controles; OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; P = probabilidade; ND = não determinado.

Há um forte desequilíbrio de ligação entre as posições do gene *IL4* (*IL4* -590 e *IL4* VNTR) nas duas subamostras EU e AF tanto em pacientes quanto nos controles (tabela 12).

TABELA 12. Valores de desequilíbrio de ligação relativo (Δ') entre as duas posições variáveis do gene *IL4*: SNP -590 (C, T) e o VNTR (1,2,3,4)

Euro-Brasileiros	Δ'
Pacientes (n=77)	0,8786
Controles (n= 108)	0,9216
Afro-Brasileiros	
Pacientes (n=52)	0,9104
Controles (n=54)	0,9510

Valores em negrito (P<0,001)

As variantes de *IL4* foram também analisadas em conjunto com as variantes de *IL13*, uma vez que estes dois genes estão localizados muito próximos no mesmo cromossomo (5q) e que há desequilíbrio de ligação entre seus alelos, além de seus produtos gênicos apresentarem efeitos parcialmente redundantes.

As frequências haplotípicas não foram obtidas por análise de segregação em famílias, mas por intermédio de estimativas através do algoritmo EM. Desta forma, é possível que, considerando o tamanho amostral, as frequências dos haplótipos, especialmente as dos mais raros, sejam bastante imprecisas ou até mesmo inexistentes.

Os SNPs analisados foram *IL13* -1111(C,T), *IL13* +2044 (G,A), *IL13* +2525(G,A) e *IL4* -590 (C,T) e o VNTR de *IL4*. Quando analisamos estas posições de *IL13* e *IL4* aos pares, verificamos associação positiva entre PF e o haplótipo *IL4* VNTR2_ *IL13* +2525A em EU (OR =2,16) e associações negativas entre PF e os haplótipos *IL4* VNTR1_ *IL13*+2525A e *IL4* -590C_ *IL13*+2044A em EU (OR = 0,43 e OR = 0,41, respectivamente) (tabelas 13 e 14). A análise dos haplótipos formados por pares de SNPs de *IL4* e *IL13* na subamostra de afro-brasileiros de pacientes e controles não revela associações com PF (tabelas 13 e 14).

Realizamos também a análise de associação entre os haplótipos dos 4 SNPs estudados e VNTR de *IL4* com a doença pênfigo foliáceo.

Novamente, os haplótipos não foram obtidos por análise de segregação em famílias. Em função disso e do tamanho amostral, alguns dos haplótipos podem ser inexistentes, por exemplo, C1CAA e C1TAA na subamostra AF (tabela 15). Portanto, representamos apenas aqueles haplótipos das cinco posições (*IL4* -590_ *IL4* VNTR_ *IL13* -1111_ *IL13* +2044_ *IL13* +2525) com frequência superior a 5% em ao menos um dos grupos estudados (tabela 15).

O haplótipo C1CGG é o mais comum em pacientes e controles das duas subamostras analisadas. O haplótipo C1CAA apresenta frequência inferior no grupo de pacientes euro-brasileiros (OR = 0,13). Observamos uma frequência superior dos haplótipos C1TGG e T2CAA no grupo de pacientes euro-brasileiros, indicando que os mesmos estão associados positivamente com o PF (OR = 10,90 e OR = 4,24, respectivamente) (tabela 15). As frequências destes haplótipos não diferiram significativamente na subamostra de afro-brasileiros entre os controles e pacientes. Neste grupo populacional o haplótipo associado positivamente com o PF é T2TAA (OR = 13,99).

TABELA 13. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências haplotípicas (%) para as posições *IL4VNTR* e *IL13 +2044*, *IL4VNTR* e *IL13 -1111* e para *IL4VNTR* e *IL13 +2525*

Haplótipos		Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
IL4 VNTR	IL13 +2044	Pacientes n=63	Controles n=226	OR	IC 95%	P	Pacientes n=52	Controles n=63	OR	IC 95%	P
1	A	12,30	16,40	0,72	0,40-1,29	0,402	14,25	14,65	0,96	0,46-2,02	1,000
1	G	56,75	59,92	0,88	0,59-1,31	0,614	46,33	49,63	0,88	0,52-1,48	0,688
2	A	15,48	9,93	1,66	0,94-2,94	0,078	15,56	14,71	1,07	0,52-2,21	0,856
2	G	15,47	13,53	1,17	0,67-2,04	0,468	21,94	20,21	1,11	0,59-2,09	0,869
4	A	0	0	----	----	----	0	0,79	ND	ND	ND
4	G	0	0,22	ND	ND	ND	0,96	0	ND	ND	ND
3	A	0	0	----	----	----	0,96	0	ND	ND	ND
IL4 VNTR	IL13 -1111	n=62	n=208	OR	IC 95%	P	n=49	n=57	OR	IC 95%	P
1	C	51,9	60,4	0,71	0,47-1,06	0,096	43,0	43,3	0,99	0,57-1,70	1,000
1	T	16,6	15,1	1,12	0,65-1,93	0,681	16,2	22,5	0,67	0,33-1,33	0,302
2	C	23,1	16,1	1,56	0,96-2,56	0,074	27,4	27,8	0,98	0,54-1,80	1,000
2	T	8,4	8,2	1,03	0,50-2,12	1,000	11,4	5,5	2,18	0,79-6,04	0,129
4	C	0	0,2	ND	ND	ND	1,0	0,9	ND	ND	ND
3	C	0	0	----	----	----	1,0	0	ND	ND	ND
IL4 VNTR	IL13+ 2525	n=53	n=158	OR	IC 95%	P	n=44	n=48	OR	IC 95%	P
1	A	8,7	18,2	0,43	0,20-0,89	0,016	12,5	10,6	1,20	0,49-2,97	0,820
1	G	61,1	58,4	1,12	0,72-1,76	0,646	47,7	51,9	0,85	0,47-1,51	0,662
2	A	18,7	9,6	2,16	1,17-3,99	0,013	14,8	15,5	0,95	0,42-2,13	1,000
2	G	11,5	13,8	0,81	0,41-1,60	0,629	22,8	21,0	1,10	0,55-2,22	0,855
4	A	0	0	----	----	----	1,1	1,0	ND	ND	ND
3	G	0	0	----	----	----	1,1	0	ND	ND	ND

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; P = probabilidade; ND = não determinado.

TABELA 14. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências haplotípicas (%) para as posições *IL4 -590* e *IL13 +2044*, *IL4 -590* e *IL13 -1111* e para *IL4 -590* e *IL13 +2525*

Haplótipos		Pacientes n=138	Controles n=177	Total			Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
<i>IL4 -590</i>	<i>IL13 +2044</i>			OR	IC 95%	<i>P</i>	Pacientes n=77	Controles n=118	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pacientes n=61	Controles n=57	OR	IC 95%	<i>P</i>
C	A	11,0	16,5	0,63	0,39-1,00	0,052	8,7	18,7	0,41	0,22-0,79	0,005	13,4	12,0	1,13	0,52-2,43	1,000
C	G	49,5	52,1	0,90	0,66-1,23	0,518	55,0	54,6	1,01	0,67-1,52	1,000	43,2	46,8	0,87	0,52-1,45	0,695
T	A	15,4	11,8	1,37	0,86-2,16	0,184	16,6	10,1	1,77	0,97-3,22	0,059	14,5	15,2	0,95	0,46-1,95	1,000
T	G	24,1	19,6	1,45	0,99-2,13	0,057	19,7	16,6	1,24	0,73-2,09	0,512	28,9	26,0	1,16	0,65-2,05	0,772
<i>IL4 -590</i>	<i>IL13 -1111</i>	n=133	n=158	OR	IC 95%	<i>P</i>	n=76	n=105	OR	IC 95%	<i>P</i>	n=57	n=52	OR	IC 95%	<i>P</i>
C	C	47,0	54,7	0,73	0,53-1,02	0,071	51,2	59,3	0,72	0,47-1,09	0,162	41,6	45,0	0,87	0,51-1,49	0,571
C	T	12,8	13,7	0,93	0,57-1,50	0,802	12,0	13,6	0,68	0,37-1,28	0,266	13,7	14,6	0,93	0,43-1,99	1,000
T	C	28,2	20,9	1,48	1,01-2,17	0,041	25,8	17,8	1,06	0,63-1,79	1,000	31,2	27,1	1,22	0,68-2,19	0,450
T	T	12,0	10,7	1,14	0,68-1,91	0,685	11,0	9,3	0,84	0,42-1,68	0,727	13,5	13,3	1,02	0,47-2,23	1,000
<i>IL4 -590</i>	<i>IL13 +2525</i>	n=107	n=127	OR	IC 95%	<i>P</i>	n=60	n=85	OR	IC 95%	<i>P</i>	n=47	n=42	OR	IC 95%	<i>P</i>
C	A	9,9	15,6	0,59	0,34-1,04	0,072	9,1	17,6	0,47	0,23-0,98	0,060	10,5	10,6	0,99	0,38-2,59	1,000
C	G	49,4	51,7	0,91	0,64-1,31	0,709	53,4	55,3	0,92	0,58-1,48	0,8083	44,8	45,4	0,98	0,54-1,77	1,000
T	A	16,7	11,2	1,60	0,94-2,72	0,083	18,4	10,0	2,02	1,02-4,00	0,054	15,0	14,4	1,05	0,46-2,41	1,000
T	G	24,0	21,5	1,15	0,74-1,77	0,574	19,1	17,1	1,15	0,63-2,11	0,660	29,7	29,6	1,00	0,53-1,91	1,000

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; *P* = probabilidade

TABELA 15. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências haplotípicas (%) dos genes *IL4* e *IL13*

		Haplótipos			Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
<i>IL4</i>	<i>IL4</i>	<i>IL13</i>	<i>IL13</i>	<i>IL13</i>	Pac	Con	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac	Con	OR	IC 95%	<i>P</i>
-590	VNTR	-1111	+2044	+2525	n=	n=				n=	n=			
					51	73				38	39			
C	1	C	A	A	1,3	9,3	0,13	0,02-0,77	0,005	3,9	1,9	1,96	0,28-13,73	0,681
C	1	T	A	A	3,0	5,8	0,50	0,13-1,90	0,531	3,8	4,9	0,77	0,16-3,69	1,000
C	1	C	G	G	38,8	50,1	0,63	0,38-1,06	0,123	25,8	35,7	0,63	0,31-1,25	0,215
C	1	T	G	G	8,9	1,0	10,90	1,70-69,77	0,002	8,2	12,3	0,63	0,22-1,83	0,431
T	2	C	A	A	8,4	2,2	4,24	1,13-15,96	0,033	8,2	11,2	0,71	0,24-2,09	0,583
T	2	T	A	A	5,6	6,5	0,85	0,29-2,48	0,800	7,6	0	13,99	0,77-253,66	0,015
T	2	C	G	G	8,0	9,5	0,82	0,33-2,03	0,819	20,2	13,4	1,63	0,69-3,85	0,282
Outros haplótipos com frequência inferior a 5%					26,1	15,7	---	---	---	22,3	20,6	---	---	---

Pac = Pacientes; Con = Controles; OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; *P* = probabilidade.

5.3. Análise do gene *PDCDI*

Pacientes EU e pacientes AF não diferem quanto às frequências alélicas para os SNPs *PDCDI* +7146 (G, A), também denominado PD1.3, *PDCDI* +7785 (C,T) ou PD1.5 e *PDCDI* +8737(G, A) ou PD1.6 ($P = 0,310$; $0,897$ e $1,00$, respectivamente). As subamostras de EU e AF de controles também são homogêneas quanto à distribuição das frequências alélicas dos SNPs PD1.3 e PD1.5 ($P = 0,165$ e $0,738$, respectivamente), porém diferem quanto às frequências alélicas de PD1.6 ($P = <10^6$). Os resultados de SNP PD1.6 não foram usados para análise de interação gênica, uma vez que não foi possível agrupar as duas subamostras de EU e AF em uma amostra total.

As frequências genóticas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as posições polimórficas analisadas nas amostras totais de pacientes e controles, assim como nas subamostras de euro-brasileiros e de afro-brasileiros (tabelas 16,17 e 18).

As estimativas de desequilíbrio de ligação entre os SNPs de *PDCDI* indicam desequilíbrios entre PD1.3 e PD1.5 de maior significância estatística nos controles do que nos pacientes da subamostra de EU. O desequilíbrio entre PD1.5 e PD1.6 também é mais significativo nos controles do que nos pacientes EU e a mesma situação é observada na subamostra de AF. Há ausência de desequilíbrio de ligação entre PD1.5 e PD1.6 nos pacientes AF, porém, observa-se um desequilíbrio intermediário na subamostra de EU. O desequilíbrio de ligação entre PD1.3 e PD1.6 é absoluto e significativo nos pacientes EU bem como nos controles AF, mas não é significativo em pacientes AF (tabela 19).

A comparação das frequências alélicas, genóticas e de portadores de cada alelo do SNP *PDCDI* +7785(C,T) ou PD1.5 demonstra a ausência de associação com PF nas amostras de euro-brasileiros, de afro-brasileiros, bem como na amostra total (tabela 17). Também não encontramos associações entre o PF e as frequências alélicas, genóticas e de portadores do SNP *PDCDI* +7146 (G,A) ou PD1.3 nas subamostras EU e AF e na amostra total, porém, na amostra total, observamos uma associação negativa com valor de P próximo à $0,05$ entre PF com o estado de portador do alelo PD1.3A (genótipos A/A e A/G). Observa-se também que o genótipo A/G apresenta uma tendência de associação negativa com PF (tabela 16). Apesar de não verificarmos associação individual deste SNP com PF, este polimorfismo tem relevância quando analisamos a sua interação com outros polimorfismos gênicos, como será abordado no tópico 5.5.

A comparação de frequências de portadores das variantes alélicas da posição +8737 (PD1.6) na amostra de euro-brasileiros demonstra associação positiva do alelo +8737A com PF (OR = 2,07), associação esta não observada nas amostras de afro-brasileiros e total (tabela 18). As frequências alélicas de PD1.6 diferem também de forma estatisticamente significativa entre controles e pacientes na subamostra EU, com frequência mais elevada do alelo A nos pacientes (tabela 18).

As frequências do genótipo A/A do SNP +8737(PD1.6) não diferem significativamente entre as amostras de pacientes e controles euro-brasileiros e afro-brasileiros. O genótipo A/G está associado positivamente com PF na amostra de euro-brasileiros (OR = 2,12). Não foram observadas associações na subamostra AF (tabela 18).

Foi realizada análise de associação entre os haplótipos constituídos dos SNPs de *PDCDI* e PF e observamos que o haplótipo PD1.3G_PD1.6A está associado positivamente com a doença em EU e uma tendência oposta na amostra AF (OR = 2,07 e 0,54, respectivamente) (tabela 20). O haplótipo PD1.5 C_PD1.6 A está associado positivamente com PF em EU (OR = 2,69), mas em AF o valor de OR é 0,82, sem significância estatística.

Considerando a análise conjunta das três posições de *PDCDI*(PD1.3_PD1.5_PD1.6), verificamos que o haplótipo GCA está associado positivamente com a doença (OR = 3,32) na amostra de euro-brasileiros, mas sua frequência não difere significativamente entre pacientes e controles das amostras de afro-brasileiros (tabela 19).

A frequência do haplótipo GTA é menor, com significância estatística, nos pacientes quando comparada aos controles da subamostra afro-brasileira, indicando que este haplótipo está associado negativamente com a doença (OR = 0,39). Em EU não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para este haplótipo entre os pacientes e controles (tabela 20).

TABELA 16. Comparação das frequências (%) alélicas, genóticas e de portadores das variantes do SNP *PDCDI +7146(G,A)*, ou PD1.3 entre pacientes com PF e controles

Frequências	Total		OR	IC 95%	P	Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
	pacientes n= 138	controles n=302				pacientes n=75	controles n=244	OR	IC 95%	P	pacientes n=63	controles n=58	OR	IC 95%	P
Portadores															
G	99,3	99,0	1,34	0,14-12,98	1,000	98,7	98,8	0,92	0,09-8,99	1,000	100,00	100,00	1,09	0,02-55,59	1,000
A	10,9	18,2	0,55	0,30-1,02	0,071	13,3	19,7	0,63	0,30-1,31	0,231	7,9	12,1	0,63	0,19-2,10	0,547
Alélicas															
G	94,2	90,4	1,71	0,96-3,03		92,7	89,6	1,47	0,75-2,91		96,0	94,0	1,55	0,48-5,04	
A	5,8	9,6	0,59	0,33-1,04	0,068	7,3	10,4	0,68	0,34-1,34	0,358	4,0	6,0	0,64	0,20-2,09	0,560
Genóticas															
G/G	89,1	81,8	1,00			86,7	80,3	1,00			92,1	87,9	1,00		
A/G	10,1	17,2	0,54	0,29-1,01	0,056	12,0	18,5	0,60	0,28-1,30	0,219	7,9	12,1	0,63	0,19-2,10	0,548
A/A	0,7	1,0	ND	ND	ND	1,3	1,2	ND	ND	ND	0	0	---	---	---
Hardy-Weinberg (P)	0,374	0,744				0,328	0,733				1,000	1,000			

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; P = probabilidade; ND = não determinado.

TABELA 17. Comparação das frequências (%) alélicas, genóticas e de portadores das variantes do SNP *PDCDI* +7785 (C,T) ou PD1.5 entre pacientes com PF e controles

Frequências	pacientes n= 131	Total controles =288	OR	IC 95%	P	Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
						pacientes n=76	controles n=231	OR	IC 95%	P	pacientes n=55	controles n=57	OR	IC 95%	P
Portadores															
C	88,5	86,8	1,19	0,63-2,26	0,643	89,5	86,6	1,32	0,58-3,00	0,693	87,3	87,7	0,96	0,31-2,94	1,000
T	60,3	57,3	1,18	0,77-1,80	0,437	60,5	56,3	1,19	0,70-2,02	0,591	60,0	61,4	0,94	0,44-2,01	1,000
Alélicas															
C	64,1	64,8	0,96	0,70-1,30		64,5	65,2	0,97	0,66-1,42		63,6	63,2	1,02	0,59-1,76	
T	35,9	35,2	1,05	0,77-1,42	0,818	35,5	34,8	1,03	0,70-1,51	0,921	36,4	36,8	0,98	0,57-1,69	1,000
Genóticas															
T/T	11,4	13,2	1,00			10,5	13,4	1,00			12,7	12,3	1,04	0,34-3,19	
C/T	48,9	44,1	1,28	0,65-2,49	0,510	50,0	42,9	1,49	0,63-3,52	0,423	47,3	49,1	0,93	0,29-3,01	1,000
C/C	39,7	42,7	1,07	0,54-2,11	1,000	39,5	43,7	1,15	0,48-2,78	0,827	40,0	38,6	1,00	0,30-3,33	1,000
Hardy-Weinberg (P)															
	0,567	0,610				0,613	0,385				1,000	0,778			

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; P = probabilidade

TABELA 18. Comparação das freqüências (%) alélicas, genótípicas e de portadores das variantes do SNP *PDCD1* +8737 (G,A) ou PD1.6 entre pacientes com PF e controles

Freqüências	Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
	pacientes n=71	controles n=191	OR	IC 95%	<i>P</i>	pacientes n=51	controles n=51	OR	IC 95%	<i>P</i>
Portadores										
<i>G</i>	95,8	96,9	0,74	0,18-3,02	0,704	92,2	86,3	1,87	0,51-6,83	0,530
<i>A</i>	43,7	27,2	2,07	1,18-3,65	0,012	41,2	56,9	0,53	0,24-1,17	0,164
Alélicas										
<i>G</i>	76,1	84,8	0,57	0,35-0,92		75,5	64,7	1,68	0,92-3,08	
<i>A</i>	23,9	15,2	1,76	1,09-2,83	0,028	24,5	35,3	0,60	0,32-1,09	0,123
Genótípicas										
<i>G/G</i>	56,3	72,8	1,00			58,8	43,2	1,00		
<i>A/G</i>	39,5	24,1	2,12	1,18-3,80	0,012	33,3	43,1	0,57	0,24-1,31	0,203
<i>A/A</i>	4,2	3,1	1,74	0,42-7,26	0,434	7,9	13,7	0,42	0,11-1,61	0,313
Hardy-Weinberg (<i>P</i>)	0,745	0,400				0,463	0,763			

OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; *P* = probabilidade

TABELA 19. Valores de desequilíbrio de ligação relativo(Δ') entre os SNPs do gene *PDCDI* nas subamostras de EU e AF de pacientes e controles

Controles	<i>PDCDI</i> +7785 (<i>PDI.5</i>)			<i>PDCDI</i> +8737 (<i>PDI.6</i>)	
	Total n=218	EU n=176	AF n=46	EU n=176	AF n=46
<i>PDCDI</i> +7143 (<i>PDI.3</i>)	0,7537 ^a	0,7339 ^a	1,0000 ^b	0,2093 ^c	1,0000 ^b
<i>PDCDI</i> +7785 (<i>PDI.5</i>)				0,4416 ^a	0,2299 ^a
Pacientes	Total n=101	EU n=58	AF n=44	EU n=58	AF n= 44
<i>PDCDI</i> +7143(<i>PDI.3</i>)	1,0000 ^b	1,0000 ^b	1,0000 ^c	1,0000 ^b	1,0000 ^c
<i>PDCDI</i> +7785 (<i>PDI.5</i>)				0,2000 ^b	0,0538 ^c

Valores de desequilíbrio a: $P < 0,001$; b: $0,05 > P > 0,001$; c: $P > 0,05$;
EU: Euro-brasileiros; AF: Afro-brasileiros

TABELA 20. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências haplotípicas (%) do gene *PDCDI*

Haplótipos			*Total					Euro-Brasileiros					Afro-Brasileiros				
PD 1.3	PD 1.5	PD 1.6	Pacientes	Controles	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pacientes n=58	Controles n=176	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pacientes n=44	Controles n=46	OR	IC 95%	<i>P</i>
A	C	G	ND	ND				8,6	9,8	0,87	0,41-1,81	0,856	3,4	5,4	0,61	0,14-2,65	0,724
G	C	A	ND	ND				13,2	4,4	3,32	1,59-6,96	0,004	15,9	16,7	0,95	0,43-2,09	1,000
G	C	G	ND	ND				42,8	49,0	0,78	0,51-1,19	0,261	45,4	38,8	1,31	0,73-2,38	0,451
G	T	A	ND	ND				11,8	9,2	1,30	0,67-2,54	0,373	8,0	18,1	0,39	0,15-0,99	0,048
G	T	G	ND	ND				23,6	25,5	0,91	0,55-1,48	0,714	27,3	21,0	1,41	0,71-2,81	0,392
A	C	A	ND	ND				0	0,7	ND	ND	ND	0	0	----	----	----
A	T	A	ND	ND				0	0,7	ND	ND	ND	0	0	----	----	----
A	T	G	ND	ND				0	0,7	ND	ND	ND	0	0	----	----	----
PD 1.3		PD 1.6						n=59	n=178	OR	IC 95%	<i>P</i>	n=47	n=48	OR	IC 95%	<i>P</i>
A		A	ND	ND				0	1,6	ND	ND	ND	1,8	0,1	ND	ND	ND
A		G	ND	ND				8,4	10,2	0,81	0,39-1,69	0,716	2,4	5,1	0,47	0,08-2,29	0,444
G		A	ND	ND				24,6	13,6	2,07	1,23-3,46	0,005	22,7	35,4	0,54	0,28-1,02	0,061
G		G	ND	ND				67,0	74,6	0,69	0,44-1,08	0,115	73,1	59,4	1,85	1,00-3,41	0,061
PD 1.3	PD 1.5		n=113	n=265	OR	IC 95%	<i>P</i>	n=63	n=217	OR	IC 95%	<i>P</i>	n=51	n=53	OR	IC 95%	<i>P</i>
A	C		6,6	9,4	0,69	0,38-1,25	0,276	8,7	10,3	0,83	0,42-1,66	0,739	3,9	5,6	0,68	0,19-2,48	0,749
G	C		59,3	55,7	1,16	0,84-1,59	0,404	57,9	54,7	1,14	0,77-1,71	0,545	61,8	58,5	1,15	0,66-2,00	0,680
G	T		34,1	34,1	1,00	0,72-1,39	1,000	33,4	34,0	0,97	0,64-1,47	0,913	34,3	35,9	0,93	0,53-1,65	0,883
A	T		0	0,8	ND	ND	ND	0	1,0	ND	ND	ND	0	0	---	---	---
	PD 1.5	PD 1.6						n=70	n=188	OR	IC 95%	<i>P</i>	n=48	n=49	OR	IC 95%	<i>P</i>
	C	A	ND	ND				11,7	4,7	2,69	1,33-5,42	0,010	13,6	16,1	0,82	0,37-1,82	0,691
	C	G	ND	ND				51,8	59,1	0,74	0,50-1,10	0,163	48,9	43,1	1,26	0,72-2,22	0,473
	T	A	ND	ND				12,6	9,9	1,31	0,71-2,39	0,344	10,4	18,6	0,50	0,22-1,16	0,156
	T	G	ND	ND				23,9	26,3	0,88	0,56-1,38	0,566	27,1	22,2	1,31	0,68-2,51	0,500

*Devido à heterogeneidade das amostras para o gene PD1.6 não foi avaliada a distribuição dos haplótipos na amostra total; OR = Odds ratio; IC = Intervalo de Confiança; *P* = probabilidade

5.3.1 Análise do microssatélite de *PDCDI*

Ao analisarmos o microssatélite do gene *PDCDI* (trinucleotídeo CTG) em 10 amostras constituintes do grupo controle da subamostra EU não encontramos nenhuma variação. Sendo assim, optamos por realizar um levantamento de frequências alélicas deste microssatélite em diversos grupos étnicos, cujas amostras se encontravam disponíveis no Laboratório de Genética Molecular Humana.

Os resultados desta tipificação indicam que este microssatélite apresenta poucos alelos e baixo grau de polimorfismo. O alelo mais comum e presente nos 4 grupos étnicos analisados é *197, que apresenta 9 repetições CTG. Este microssatélite é monomórfico na amostra de orientais (tabela 21).

Sendo assim, não continuamos a tipificação dos pacientes de PF e dos controles para esta posição.

TABELA 21. Comparação das frequências alélicas do microssatélite *PDCDI* entre os quatro grupos étnicos

Alelos	Caucasóides n = 40	Orientais n = 20	Ameríndios n = 20	Negróides n = 15
*176	-----	----	2,5%	----
*197	98,8%	100%	97,5%	96,7%
*200	1,2%	----	-----	----
*206	----	----	-----	3,3%

5.4. Análise do gene *HLA-DRB1*

Para o gene *HLA-DRB1* utilizamos os resultados de PAVONI et al. (2003) com acréscimo de novas amostras. Após a tipificação destas, os genótipos da amostra total de pacientes e controles foram classificados e agrupados quanto aos alelos de susceptibilidade, proteção e neutralidade (apresentado no presente trabalho no item 4.8) conforme o critério de número 3 utilizado por PAVONI et al. (2003). Os fenótipos obtidos a partir desta classificação foram inseridos na amostra total de pacientes e controles (tabela 22).

Como previsto, associações positivas foram observadas entre PF e o fenótipo de susceptibilidade (OR = 3,91); e associações negativas entre PF e o fenótipo de proteção (OR = 0,15). O fenótipo neutro não está associado com PF (tabela 22).

TABELA 22. Comparação das amostras de pacientes com PF e controles quanto às frequências fenotípicas (%) do gene *HLA-DRB1*

Fenótipos	Total		OR	IC 95%	P
	Pacientes n=126	Controles n= 301			
Neutralidade	26,2	32,9	1,00		
Susceptibilidade	68,3	21,9	3,91	2,34-6,50	<10⁻⁶
Proteção	5,5	45,2	0,15	0,07-0,36	<10⁻⁶

Fenótipo susceptibilidade: genótipos S/S e S/N

Fenótipo neutro: genótipos N/N e S/P

Fenótipo proteção: P/P e P/N

5.5 Análise de interação entre os genes *HLA-DRB1*, *PDCD1*, *IL13*, *DSG1*, *IL4*, *IL6* e *IL4R* no que se refere à susceptibilidade ao PF (Pênfigo foliáceo)

Considerando os resultados obtidos em estudos de associação com PF realizados anteriormente no LGMH-UFPR e os resultados do presente trabalho, realizamos uma análise de regressão logística para detectar possíveis interações entre os genes *HLA-DRB1*, *PDCD1*, *DSG1*, *IL13*, *IL4*, *IL6* e *IL4R* no que se refere à susceptibilidade ao PF. Para cada SNP dos genes *PDCD1*, *IL4*, *IL6*, *IL4R* e *DSG1*, foi conferido o valor 2 ao genótipo homocigoto com maior valor de OR, ao heterocigoto, o valor de 1 e ao outro homocigoto, o valor zero (tabela 23). A codificação dos fenótipos do gene *HLA-DRB1* está na tabela 5. O modelo de regressão logística proposto considera uma relação de epistasia entre as variáveis destes genes.

Para análise de interação gênica empregamos a amostra total devido ao pequeno tamanho das subamostras EU e AF e desta forma não consideramos os dados obtidos para SNP P+8737 (G,A) ou PD1.6 e para *IL4 VNTR*, uma vez que as subamostras EU e AF de controles não são homogêneas. Por esta razão, excluímos da análise de regressão logística os polimorfismos que apresentaram diferenças significativas de frequência na comparação EU x AF. Porém, devido ao forte desequilíbrio de ligação entre *IL4 VNTR* e *IL4 -590* apresentados na tabela 12 deste estudo, os resultados das possíveis interações observadas para o SNP -590 podem ser estendidos ao polimorfismo VNTR deste gene.

Antes da análise de regressão logística, verificamos a independência das variáveis *IL13 -1111*, *IL13 +2044*, *IL13 +2525*, *HLA-DRB1*, *IL6 -174*, *IL4R*, *IL4 -590*, *DSG1 +809*, *DSG1 +1660*, PD1.3 e PD1.5, através do teste de χ^2 . Não foram observados valores significativos, a ponto de indicarem dependência entre as variáveis.

TABELA 23. Codificação dos genótipos dos genes *IL13*, *PDCD1*, *DSG1*, *IL4*, *IL6* e *IL4R* para análise de regressão logística

Valores para regressão logística	<i>IL13</i>	<i>IL13</i>	<i>IL13</i>	<i>PDCD1</i>	<i>PDCD1</i>	<i>DSG1</i>	<i>DSG1</i>	<i>IL6</i>	<i>IL4</i>	<i>IL4R</i>
	-	+2044	+2525	+7146	+7785	+809	+1660	-	-	
	<i>1111</i>	ou (exon4)	ou (UTR)	ou (PD1.3)	ou (PD1.5)			174	590	
ZERO (0)	C/C	A/A	G/G	A/A	T/T	T/T	A/A	C/C	C/C	A/A
UM (1)	C/T	G/A	G/A	G/A	C/T	C/T	A/C	G/C	C/T	A/G
DOIS (2)	T/T	G/G	A/A	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	T/T	G/G

No modelo para análise de regressão foram testadas as probabilidades de interferência na manifestação ou não da doença em um indivíduo, quando na presença das variáveis independentes supracitadas.

Foi realizado um teste de regressão logística independente para cada uma das variáveis mencionadas na tabela 23 e, selecionamos as variáveis que apresentaram neste teste o valor de $P < 0,25$, para constituírem o modelo de interação proposto. Entre os fatores de risco independentes que interferem de forma significativa na manifestação do PF, os fenótipos de *HLA-DRB1* respondem por 31,0% da variação da ocorrência da doença enquanto que os genótipos de *IL4 -590*, por 2,1% (tabela 24), segundo os valores de R^2 de Nagelkerke obtidos do pacote estatístico SPSS.

TABELA 24. Resultados de cinco análises de regressão logística considerando cada gene individualmente

Variáveis	n	P	OR	IC – 95%	R ²
<i>PD1.3</i>	445	0,070	1,69	0,96-2,99	1,1%
<i>IL6 -174</i>	325	0,074	1,40	0,97-2,02	1,3%
<i>IL4-590</i>	318	0,026	1,46	1,05-2,03	2,1%
<i>IL4R</i>	322	0,188	1,24	0,90-1,69	0,7%
<i>HLA-DRB1</i>	427	<10⁻⁴	4,63	3,29-6,52	31,0%

R²: representa o poder explicativo da variável no modelo; OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança; P = probabilidade; n = tamanho amostral.

Os genes *HLA-DRB1*, *IL4 -590*, *IL4R*, *IL6 -174* e *PD1.3* foram selecionados para análise conjunta no modelo de regressão logística. Neste modelo, sem considerar a interação entre os genes, as variáveis *HLA-DRB1* e *IL4 -590* apresentaram valores de P significativos ($P = 10^{-4}$ e $P = 0,006$, respectivamente) e o valor de -2 Log da verossimilhança foi de 282,650. Este valor foi considerado referência para as comparações com o modelo, cujas interações de segunda ordem foram inseridas.

O procedimento realizado para testar as possíveis interações de segunda ordem foi a inclusão e a retirada das interações manualmente. A cada passo de inclusão era verificada a influência da interação no modelo proposto através das diferenças entre os valores -2 Log da verossimilhança do modelo básico e do modelo com a interação. Ao final de 10 procedimentos de inserção de interações entre as variáveis, obtivemos um modelo final (tabela 25) cuja diferença no valor de -2 Log da verossimilhança foi 7,516. As diferenças de valor de -2 Log da verossimilhança nos modelos contendo as demais interações não foram consideradas significativas. Portanto, o modelo final apresenta a inserção da interação entre *PD1.3* e *IL4 -590*, uma vez que a inserção das demais interações não resultaram em efeitos significativos para a explicação da doença. Além disso, o ajustamento do modelo foi testado segundo o teste de Hosmer e Lemeshow que forneceu um valor de $\chi^2 = 4,619$, e um valor de $P = 0,797$, indicando que o modelo proposto ajusta os dados em um nível aceitável ($P > 0,05$).

TABELA 25. Modelo final de regressão logística para pacientes com PF e controles

	B	EP	Wald	GL	P	OR
Passo 1						
<i>IL4R</i>	,195	,210	,859	1	,354	1,215
<i>HLA-DRB1</i>	1,397	,214	42,581	1	,000	4,042
PD1.3	-1,144	,757	2,286	1	,131	,319
<i>IL4 -590</i>	-3,463	1,648	4,416	1	,036	,031
<i>IL6 -174</i>	,279	,243	1,311	1	,252	1,321
<i>IL4-590 por PD1.3</i>	2,128	,849	6,274	1	,012	8,394
constante	-1,136	1,516	,562	1	,453	,321

n = 264 (tamanho amostral)

B = coeficiente de regressão para a interação; EP = erro padrão do valor de B; Wald = teste de significância de “Wald”; GL = graus de liberdade; P = probabilidade; OR = *Odds Ratio*.

Os resultados da regressão logística indicam que existe interação entre os genótipos de PD1.3 e os genótipos de *IL4 -590* ($P = 0,012$) (tabela 25). A fim de verificarmos as combinações genóticas responsáveis por esta interação realizamos análises estratificadas entre os polimorfismos destes genes (tabela 26).

Devido à baixa frequência do alelo A de PD1.3 em nossa amostra, não observamos na análise estratificada entre PD1.3 e *IL4 -590*, indivíduos com o genótipo A/A de PD1.3, portanto, todos os portadores do alelo A (A+) deste SNP apresentam o genótipo G/A de PD1.3.

No estrato A+ de PD1.3, somente o genótipo C/T de *IL4 -590* confere proteção ao PF (OR = 0,15); os demais genótipos homocigotos de *IL4 -590* não conferem efeitos estatisticamente significativos na doença quando em combinação com o estado de portador do alelo A de PD1.3 (tabela 26). Verifica-se também que os indivíduos portadores do alelo T de *IL4 -590* e do alelo A de PD1.3 estão protegidos contra o PF (OR = 0,16). Por outro lado, observa-se que conforme o genótipo de PD1.3 e o estrato *IL4 -590* ocorre diferenças na predisposição à doença. Na presença do genótipo T/T de *IL4 -590*, o genótipo G/G de PD1.3 confere susceptibilidade ao PF (OR = 2,55) (tabela 26).

TABELA 26. Análise de interação entre os SNPs PD1.3 e *IL4* -590

Polimorfismos		Controles n=166 (%)		Pacientes n= 118 (%)		P	OR	IC 95%
<i>IL4</i> -590		<i>PD 1.3</i> G/G (+)				0,019	2,55	1,16-5,62
<i>T/T</i>	+	11	(7,6)	19	(17,4)			
<i>C</i>	+	133	(92,4)	90	(82,6)			
<i>IL4</i> -590		<i>*PD 1.3</i> A (+)				1,000	0,79	0,07-8,81
<i>T/T</i>	+	3	(13,6)	1	(11,1)			
<i>C</i>	+	19	(86,4)	8	(88,9)			
<i>*PD 1.3</i>		<i>IL4-590</i> T (+)				0,002	0,16	0,05-0,58
<i>A</i>	+	18	(20,2)	3	(4,0)			
<i>G/G</i>	+	71	(79,8)	72	(96,0)			
<i>*PD 1.3</i>		<i>IL4-590</i> C (+)				0,307	0,62	0,26-1,48
<i>A</i>	+	19	(12,5)	8	(8,2)			
<i>G/G</i>	+	133	(87,5)	90	(91,8)			
<i>*PD 1.3</i>		<i>IL4 -590</i> C/C (+)				0,162	2,96	0,79-11,14
<i>A</i>	+	4	(5,2)	6	(14,0)			
<i>G/G</i>	+	73	(94,8)	37	(86,0)			
<i>*PD 1.3</i>		<i>IL4 -590</i> C/T (+)				0,007	0,15	0,03-0,69
<i>A</i>	+	15	(20,0)	2	(3,6)			
<i>G/G</i>	+	60	(80,0)	53	(96,4)			
<i>*PD 1.3</i>		<i>IL4 -590</i> T/T (+)				0,280	0,19	0,02-2,09
<i>A</i>	+	3	(21,4)	1	(5,0)			
<i>G/G</i>	+	11	(78,6)	19	(95,0)			

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança * não foram observados genótipos A/A em combinação com os genótipos de *IL4* -590.

Realizamos também análises estratificadas entre os genes *HLA-DRB1* e PD1.3, *HLA-DRB1* e *IL4 -590*, *IL6 -174* e PD1.3 e entre *IL4R* e *IL4 -590*. Empregamos esta complementação de análise, pois existia uma limitação amostral para análise de regressão, uma vez que esta só considerava casos com tipificação completa para todas as variáveis. O tamanho amostral para as análises estratificadas era maior que aqueles empregados nas análises de regressão logística.

Um maior tamanho amostral pode permitir a detecção de interações que não seriam reveladas pela análise de regressão logística. Além disso, a escolha destes genes para análise de interação também foi embasada no conhecimento das funções exercidas pelas moléculas codificadas por estes genes. As análises estratificadas foram realizadas através das tabelas de contingência e de testes de χ^2 .

O gene *PDCDI* codifica uma molécula reguladora, PD-1, que inibe a ativação de células T e B. A inibição é resultante, entre outros fatores, da influência dos tipos e quantidades de citocinas presentes no meio celular. Considerando a interação funcional entre a molécula de PD-1 e das citocinas, no presente estudo, testamos a ocorrência de interações entre as variantes do gene *PDCDI* e as dos genes das citocinas *IL6* e *IL4* no que se refere à manifestação do PF. Estas duas citocinas foram selecionadas, pois a análise individual de cada uma delas apresentava um polimorfismo associado ao PF. Neste trabalho realizamos análises estratificadas entre PD1.3 e o SNP *IL6 -174*, que havia sido analisado no trabalho e PEREIRA et al. (2004), e nossos dados não demonstraram interação entre estes polimorfismos. É possível que a interação entre *IL6* e PD1.3 module a susceptibilidade ao PF, porém não encontramos significância estatística (dados não demonstrados).

Verificamos, também uma possível interação entre os fenótipos do gene *HLA-DRB1* e PD1.3. Estratificando-se a amostra quanto ao estado portador do alelo de PD1.3, verificamos que predominam os efeitos isolados dos fenótipos de *HLA-DRB1*. As diferenças entre os valores de OR entre os estratos PD1.3 A + e G/G + devem-se à baixa frequência do alelo A (tabela 27).

Quando estratificamos a amostra de acordo com o fenótipo para *HLA-DRB1*, nota-se que a presença do alelo PD1.3 A parece exercer um efeito epistático sobre a susceptibilidade do fenótipo *HLA-DRB1*. Os indivíduos portadores deste alelo estão protegidos contra o PF (OR = 0,24) (tabela 27). Entretanto, o valor de *P* está próximo ao limite de significância (*P* = 0,043).

Tabela 27. Análise de interação entre os genes *HLA-DRB1* e *PD1.3*

Polimorfismos		Controles n= 283 (%)		Pacientes n= 106 (%)		P	OR	IC 95%
<i>HLA-DRB1</i>		<i>PD1.3 A +</i>				0,662	1,65	0,31-8,79
Susceptível	+	10	(31,3)	3	(42,9)			
Neutro	+	22	(68,7)	4	(57,1)			
<i>HLA-DRB1</i>		<i>PD1.3 G+</i>				<10⁻⁶	3,61	2,01-6,47
Susceptível	+	55	(44,4)	69	(74,2)			
Neutro	+	69	(55,6)	24	(25,8)			
<i>HLA-DRB1</i>		<i>PD1.3 A+</i>				0,637	0,34	0,03-3,37
Protetor	+	16	(42,1)	1	(20,0)			
Neutro	+	22	(57,9)	4	(80,0)			
<i>HLA-DRB1</i>		<i>PD1.3 G+</i>				<10⁻⁶	0,13	0,05-0,36
Protetor	+	111	(61,7)	5	(17,2)			
Neutro	+	69	(38,3)	24	(82,8)			
<i>PD1.3</i>		<i>HLA-DRB1 Susceptível +</i>				0,043	0,24	0,06-0,91
A	+	10	(15,4)	3	(4,2)			
G/G	+	55	(84,6)	69	(95,8)			
<i>PD1.3</i>		<i>HLA-DRB1 Protetor +</i>				0,570	1,39	0,15-12,65
A	+	16	(12,6)	1	(16,7)			
G/G	+	111	(87,4)	5	(83,3)			
<i>PD1.3</i>		<i>HLA-DRB1 Neutro +</i>				0,312	0,52	0,16-1,67
A	+	22	(24,2)	4	(14,3)			
G/G	+	69	(75,8)	24	(85,7)			

ND = não determinado devido à baixa frequência de indivíduos G negativos.

Realizamos análises estratificadas quanto aos fenótipos de *HLA-DRB1* e genótipos de *IL4 -590* (tabela 28). Nos estratos constituídos pelos fenótipos de *HLA-DRB1*, verifica-se que a maior ou menor predisposição ao PF é conferida pelo efeito individual dos fenótipos de *HLA-DRB1*. Por exemplo, o fenótipo *HLA-DRB1* susceptível predispõe ao PF de forma independente dos genótipos de *IL4 -590*: indivíduos C+ são tão susceptíveis quanto aqueles com genótipo T/T (OR = 3,85 e OR = 10,11, respectivamente) (tabela 28).

Nas análises de associação individuais, tanto o genótipo T/T de *IL4 -590* (tabela 11) e o fenótipo de susceptibilidade de *HLA-DRB1* (tabela 22) conferem susceptibilidade ao PF (OR = 2,90 e OR = 3,91, respectivamente). O grupo de indivíduos com fenótipo *HLA-DRB1* susceptível apresenta maior risco de manifestar a doença quando apresentarem também o genótipo T/T de *IL4 -590* (OR = 7,91). Esta observação indica uma possível interação de adição entre o genótipo T/T de *IL4 -590* e o fenótipo de susceptibilidade de *HLA-DRB1*. Nota-se que indivíduos com genótipo T/T de *IL4 -590* apresentam susceptibilidade ao pênfigo quando apresentarem também o fenótipo neutro de *HLA-DRB1* (OR = 3,16); no estrato protetor de *HLA-DRB1* o efeito do genótipo T/T não é significativo estatisticamente (OR = 1,62) (tabela 28).

TABELA 28. Análise de interação entre os genes *HLA-DRB1* e *IL4 -590*

Polimorfismos		Controles n= 179 (%)		Pacientes n= 120 (%)		P	OR	IC 95%
<i>HLA-DRB1</i>		<i>IL4 -590 T/T+</i>				0,039	10,11	1,05-97,01
Susceptível	+	1	(12,5)	13	(59,1)			
Neutro	+	7	(87,5)	9	(40,9)			
<i>HLA-DRB1</i>		<i>IL4 -590 T/T +</i>				0,079	0,11	0,01-1,13
Protetor	+	7	(50,0)	1	(10,0)			
Neutro	+	7	(50,0)	9	(90,0)			
<i>HLA-DRB1</i>		<i>IL4 -590 C +</i>				<10⁻⁶	3,85	2,06-7,18
Susceptível	+	44	(44,9)	69	(75,8)			
Neutro	+	54	(55,1)	22	(24,2)			
<i>HLA-DRB1</i>		<i>IL4 -590 C +</i>				0,001	0,22	0,08-0,57
Protetor	+	68	(55,7)	6	(21,4)			
Neutro	+	54	(44,3)	22	(78,6)			
<i>IL4 -590</i>		<i>HLA-DRB1 Susceptível +</i>				0,034	7,91	1,00-62,70
T/T	+	1	(2,3)	13	(15,9)			
C	+	42	(97,7)	69	(84,1)			
<i>IL4 -590</i>		<i>HLA-DRB1 Protetor +</i>				0,528	1,62	0,17-9,53
T/T	+	7	(9,3)	1	(14,3)			
C	+	68	(90,7)	6	(85,7)			
<i>IL4 -590</i>		<i>HLA-DRB1 Neutro +</i>				0,044	3,16	1,05-9,53
T/T	+	7	(11,5)	9	(29,0)			
C	+	54	(88,5)	22	(71,0)			

P = Probabilidade; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança

As citocinas IL-4 e IL-13 utilizam receptores que compartilham a cadeia α , codificada pelo gene *IL4RA*. Considerando este fato e a sobreposição parcial das funções dessas citocinas, analisamos se existe uma interação entre estes genes no que se refere à susceptibilidade ao PF.

A fim de detectar se os genótipos dos SNPs de *IL13* e de *IL4* modificam o efeito na susceptibilidade ao PF conforme o genótipo do SNP de *IL4R*, realizamos análises estratificadas empregando tabelas de contingência. Não observamos interação gênica entre os SNPs de *IL13* e os genótipos do SNP de *IL4R* (dados não demonstrados).

Na análise individual de *IL4R* não foram observadas associações com PF (PEREIRA et al., 2004); no mesmo trabalho, os autores descrevem associação positiva com PF e o genótipo T/T de *IL4 -590*. Os resultados deste SNP foram transcritos para o presente estudo e estão dispostos na tabela 11. Quando analisamos uma possível interação entre estes polimorfismos observamos resultados significativos de ORs muito semelhantes àquelas verificadas na análise de associação individual deste SNP com PF (tabela 29). O genótipo *IL4 -590* T/T confere maior susceptibilidade ao PF em qualquer estrato de *IL4R*. A estratificação da amostra pelo *IL4 -590* também não fornece qualquer indício de ocorrência de interação gênica (tabela 29).

TABELA 29. Análise de interação entre os SNPs dos genes *IL4R* e *IL4 -590*

Polimorfismos		Controles n=178 (%)	Pacientes n= 139 (%)	P	OR	IC 95%
<i>IL4 -590</i>		<i>IL4R A/G (+)</i>		0,037	3,22	1,06-9,77
<i>T/T</i>	+	5 (5,6)	11 (15,9)			
<i>C</i>	+	85 (94,4)	58 (84,1)	0,26	2,01	0,68-5,91
<i>IL4 -590</i>		<i>IL4R A/A (+)</i>				
<i>T/T</i>	+	8 (16,3)	9 (28,1)	0,42	2,18	0,37-12,65
<i>C</i>	+	41 (83,7)	23 (71,9)			
<i>IL4 -590</i>		<i>IL4R G/G (+)</i>		0,368	0,74	0,42-1,33
<i>T/T</i>	+	2 (5,1)	4 (10,5)			
<i>C</i>	+	37 (94,9)	34 (89,5)	0,508	0,53	0,14-1,94
<i>IL4R</i>		<i>IL4 -590 C +</i>				
<i>A/A</i>	+	41 (25,2)	23 (20,0)	0,508	0,53	0,14-1,94
<i>G</i>	+	122 (74,8)	92 (80,0)			
<i>IL4R</i>		<i>IL4 -590 T/T +</i>		0,508	0,53	0,14-1,94
<i>A/A</i>	+	8 (53,3)	9 (37,5)			
<i>G</i>	+	7 (46,7)	15 (62,5)			

P = Probabilidade; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança

6. Discussão

6.1 Considerações gerais

O pênfigo foliáceo (PF) endêmico é uma doença auto-imune da pele caracterizada pela formação de auto-anticorpos que desencadeiam a formação de bolhas e erosões cutâneas, decorrentes da perda progressiva de adesão entre os queratinócitos. Os auto-anticorpos são principalmente da subclasse IgG4 e direcionados contra uma proteína da epiderme, desmogleína 1, co-responsável em promover a adesão na pele por participar da estrutura dos desmossomos. Com a ligação dos auto-anticorpos ocorre a acantólise, perda da adesão celular, e destruição das células da epiderme. No entanto, o mecanismo subjacente a este processo acantolítico não está esclarecido.

Linfócitos T com perfil Th2 foram encontrados no infiltrado inflamatório das lesões e no sangue periférico dos pacientes com PF endêmico (LIN et al., 2000; CAPRONI et al., 2001). Estas células T CD4⁺ demonstram uma resposta específica à desmogleína 1 e restrita por moléculas HLA-DR.

Entre as evidências da existência de fatores genéticos de susceptibilidade ao PF endêmico, verifica-se maior incidência da doença entre parentes consangüíneos dos probandos. Neste estudo, 25,0% dos pacientes relataram durante a entrevista ter um ou mais consangüíneos com a mesma doença. Entretanto, não avaliamos o grau de consangüinidade entre esses familiares. Em 1942, ARANHA-CAMPOS (apud MINELLI, 1986) estudou 604 pacientes e 161 (26,7%) tinham mais de um membro consangüíneo da família afetado.

Semelhante ao que ocorre em outras doenças complexas, no PF endêmico há o envolvimento de vários genes na determinação da susceptibilidade. Associações foram encontradas inicialmente com especificidades sorológicas, haplótipos e genótipos de HLA-DR e DQ (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989) e, depois, com certos alelos, genótipos e haplótipos dos genes *HLA-DRB1* e *HLA-DQA1* e *HLA-DQB1* (PAVONI et al., 2003; ROXO, 2003). Além dessas, foram encontradas associações positivas entre PF e o genótipo do SNP *IL4 -590* T/T e com o estado de portador do alelo *IL6 -174G* (genótipos G/G e G/C), porém, ausência de associação entre as variantes dos genes das interleucinas *IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL4R* e *IL10* (PEREIRA et al., 2004) e do gene do autoantígeno *DSG1* (PETZL-ERLER e MALHEIROS, 2005). Nesse último trabalho, observou-se um discreto aumento de

homozigotos C/C entre pacientes (OR = 1,50, $P = 0,078$), concordante com associações descritas para as populações francesa e tunisiana (PETZL-ERLER e MALHEIROS, 2005).

No presente estudo a busca de genes de predisposição ao PF foi realizada através da análise de associação com genes candidatos. Considerando que na gênese da doença ocorre a perda da tolerância imune com desenvolvimento de auto-anticorpos, escolhemos genes cujos produtos estão relacionados com funções reguladoras, como a molécula PD-1, e aqueles que codificam as principais citocinas do perfil Th2 dos linfócitos T, IL-4 e IL-13.

Polimorfismos identificados nesses genes parecem controlar, pelo menos em parte, os seus níveis de transcrição. Vários estudos demonstram associações de alelos, genótipos ou haplótipos constituídos por variantes polimórficas destes genes com doenças auto-imunes. Assim, investigamos a sua diversidade nos pacientes com PF e em controles sadios, visando compreender um pouco mais sobre a patogênese desta doença, ao identificar outros fatores genéticos que pudessem ser importantes na susceptibilidade ou proteção ao PF. Convém salientar que mesmo a ausência de associações entre os alelos desses genes e o PF pode ser informativa para a compreensão da doença.

6.2 Gene *IL13*

A IL-13 é uma proteína imunorreguladora envolvida na polarização das células Th precursoras em Th2, que atua na maturação, ativação e diferenciação de linfócitos B, bem como na indução da mudança de classe de imunoglobulinas para IgE e IgG4. Desempenha um importante papel na imunidade contra parasitas extracelulares, como helmintos e em atopia e asma. Variantes do gene *IL13* foram relacionados com diferenças inter-individuais de susceptibilidade a várias doenças complexas e comuns, como asma e alergias em diferentes populações.

No presente estudo, investigamos se variantes polimórficas de *IL13* estão associadas com PF. Foram analisados os SNPs *IL13* -1111(T,C), *IL13* +2044 (G,A), *IL13* +2525 (G,A) e *IL13* -591(A,G). Para este último SNP não obtivemos resultados devido a problemas de ordem técnica, pois uma das sondas empregadas na metodologia de PCR-SSOP não forneceu sinal algum na membrana, mesmo após repetições de marcação com biotina e ressíntese do

oligonucleotídeo-sonda. Devido a isso não continuamos a tipificação dos indivíduos para este polimorfismo.

O PF endêmico é caracterizado pela resposta de linfócitos T, predominantemente do tipo Th2 e presença de auto-anticorpos, na sua maioria da subclasse IgG4, contra o autoantígeno desmogleína 1. Vários estudos demonstram associações dos SNPs *-1111*, *+2044* e *+2525* do gene *IL13* com distúrbios de imunidade, como atopia, asma e níveis aumentados de IgE (GRAVES et al., 2000; HEINZMANN et al., 2000; HEINZMANN et al., 2003) VAN der POUW et al., 1999; HOWARD et al., 2001; HUMMELSHOJ et al., 2003). Porém, no presente estudo não encontramos associação entre qualquer uma destas variantes e o PF nas subamostras de euro-brasileiros e de afro-brasileiros, e tampouco na amostra total.

Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas, genótípicas e de portadores dos alelos dos SNPs de *IL13* nas subamostras EU e AF e na amostra total de controles e pacientes com PF. Estes resultados nos permitem concluir que as variantes dos SNPs analisados não constituem fatores genéticos que influenciem na patogênese da doença.

A ausência de associações entre as variantes individuais do gene *IL13* também foi observada por BEDNARCZUK et al. (2003), quando analisaram os polimorfismos *IL13 -1111* e *IL13 +2044* em um estudo caso-controle de doença de Graves, na população polonesa, e por CELÉDON et al. (2002), que não encontraram associação entre os níveis de IgE e o SNP *IL13 +2044*, em um população com alta prevalência de asma, originária da Costa Rica. HE et al. (2003) também não observaram associação entre o SNP *IL13 -1111* e o rápido declínio da função pulmonar em indivíduos fumantes euro e afro-americanos.

Nossos resultados de desequilíbrio de ligação entre os SNPs de *IL13 +2044* e *IL13 +2525*, nas subamostras EU e AF de controles e pacientes com PF, são muito semelhantes àqueles encontrados por WEI et al. (2005) que verificaram um forte desequilíbrio de ligação, na amostra de pacientes chineses com síndrome nefrótica. Em caucasóides holandeses, GRAVES et al. (2000) relatam um “quase” completo desequilíbrio de ligação entre estes SNPs.

TARAZONA-SANTOS e TISHKOFF (2005) após seqüenciarem o gene *IL13*, encontraram 31 SNPs dispostos em 88 diferentes haplótipos presentes em indivíduos procedentes da África Oriental, África Ocidental, China, Europa e América do Sul. Estes autores verificaram que as populações africanas demonstram níveis menores de desequilíbrio de ligação (valores mais baixos de Δ'), além de apresentarem um menor número de pares de

SNPs em desequilíbrio estatisticamente significativo quando comparados as populações não-africanas.

Nos controles afro-brasileiros do presente estudo observou-se ausência de desequilíbrio de ligação em dois (*IL13 -1111 _IL13 +2044* e *IL13 -1111 _IL13 +2525*) de três pares de SNPs; enquanto nos controles euro-brasileiros e na amostra total houve presença de desequilíbrio de ligação nos três pares, com valores intermediários de Δ' para *IL13 -1111 _IL13 +2044* e *IL13 -1111 _IL13 +2525*, e valores mais elevados para *IL13 +2044 _IL13 +2525*.

Os desequilíbrios de ligação dos pares *IL13 -1111 _IL13 +2044* e *IL13 -1111 _IL13 +2525*, observados apenas nos pacientes AF e ausente nos respectivos controles, pode ser decorrente da existência de locos ainda não conhecidos cujos alelos de suscetibilidade ao PF estejam em desequilíbrio de ligação com variantes alélicas destes SNPs. Por outro lado, a ausência de desequilíbrio de ligação entre *IL13 -1111* e *IL13 +2525* nos pacientes europeus e a presença observada no grupo controle desta subamostra, pode ser devido a um loco de resistência cujo alelo esteja em desequilíbrio de ligação com variantes alélicas destes polimorfismos.

Apesar do conhecimento de que as diferenças na história e na estrutura das populações européias e africanas e populações descendentes destas, podem estar moldando o padrão de desequilíbrio de ligação e assim interferir nos resultados dos estudos de associação (ZHOU et al., 2004; TARAZONA-SANTOS e TISHKOFF, 2005), o tamanho, principalmente da subamostra AF analisada neste estudo, é muito reduzido para testar a hipótese de existência de diferenças de desequilíbrio de ligação entre EU e AF, no gene *IL13*.

Neste estudo também buscamos relacionar o polimorfismo +1398(G,A) do gene *IL13RA1* com PF. Entretanto, devido a problemas técnicos com a endonuclease de restrição *MseI* empregada para identificar este SNP não foi possível a genotipagem das amostras. A técnica de eletroforese em gel desnaturante foi empregada como uma alternativa para genotipificação deste SNP, mas não obtivemos sucesso, pois não havia diferenciação de bandas entre os genótipos. Assim, optamos por cancelar a análise deste SNP neste estudo.

6.3 Gene *IL4*

A proteína IL-4 desempenha importante papel antiinflamatório, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e de enzimas proteolíticas nos monócitos (BUCHS et al., 2000). Atua na ativação e diferenciação de células B, influencia a troca de isotipos de imunoglobulinas e direciona a polarização de células Th0 para Th2 (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1997).

O polimorfismo *VNTR IL4* está localizado no intron 3 do gene *IL4* e consiste em repetições em tandem de 70 pb. O alelo 1, mais comum, apresenta três destas repetições; o alelo 2, menos freqüente, duas repetições; e o alelo 3, mais raro, tem quatro repetições. Encontramos um alelo raro e ainda não descrito que foi por nós designado de alelo 4 e apresenta uma única unidade de repetição de 70 pb. Sugerimos a sua confirmação através do sequenciamento deste segmento gênico nos três indivíduos que o apresentaram.

Em um estudo de artrite reumatóide em caucasóides franceses, foi verificada uma associação positiva entre o alelo *IL4 VNTR2*, em homo ou heterozigose, e a forma não destrutiva da doença, cujo quadro clínico é de menor gravidade (BUCHS et al., 2000). Na subamostra de euro-brasileiros do presente estudo, uma associação positiva foi também encontrada entre o PF e este alelo *IL4 VNTR2* (OR = 2,45) bem como entre o PF e o genótipo 2/2 (OR = 5,20). Uma associação negativa entre a variante *IL4 VNTR 1* e o PF foi observada nas subamostras EU (OR = 0,27) e AF (OR = 0,34).

Uma das possíveis explicações para as associações encontradas com *IL4 VNTR* é o forte e significativo desequilíbrio de ligação observado neste estudo entre esse VNTR e o SNP *IL4 -590*, cuja associação individual com PF foi demonstrada no estudo de PEREIRA et al. (2004), que verificaram uma associação negativa entre PF e presença do alelo C (genótipos C/C e C/T) (OR = 0,37); e uma associação positiva com o genótipo T/T (OR = 2,71). PEREIRA et al. (2004) sugerem que o alelo *-590T* seja relevante na patogênese do PF, uma vez que este tem como consequência funcional um aumento na transcrição do gene *IL4* (ROSENWASSER et al., 1995).

Nossos resultados demonstram que entre estes dois polimorfismos de *IL4* existe um forte desequilíbrio de ligação, o que impossibilita a determinação da associação primária com o PF. Além disso, estes polimorfismos podem ser marcadores de outro agente causal, que se encontra em desequilíbrio de ligação na região cromossômica 5q31.

Em nosso estudo, não observamos associação entre os haplótipos de *IL4* e PF na amostra de afro-brasileiros, mas verificamos que nesta subamostra há maior número de haplótipos do que em EU. A maior diversidade haplotípica em AF pode ser devida a maior diversidade em populações africanas, tal como observada para muitos polimorfismos, além da miscigenação com europeus e ameríndios. A ausência de associação das variantes de *IL4* com PF na amostra de afro-brasileiros pode estar relacionada com maior diversidade genética desse estrato populacional, no qual poderia haver mais poligenes relevantes para a manifestação desta doença. Os efeitos relativos das variantes de *IL4* e de outros fatores poderiam ser menores em AF do que em EU. Note-se, por outro lado, que o tamanho amostral de AF é inferior ao de EU, diminuindo o poder estatístico das análises.

Os resultados de associação encontrados para *IL4* permitem sugerir que um aumento na expressão de IL-4, decorrente das variantes de *IL4* positivamente associadas com o PF (-590T e/ou alelo 2 de *VNTR*) possa contribuir na diferenciação e expansão de clones de células T e B auto-reativas. Transcritos de *IL4* e de outras citocinas de resposta Th2 foram encontrados nas lesões epidérmicas e também nos clones de linfócitos T CD4+, específicos para Dsg1, isolados de sangue periférico de pacientes com PF endêmico (LIN et al., 2000; CAPRONI et al., 2001).

O aumento da expressão de *IL4* pode também contribuir na produção de auto-anticorpos no PF endêmico facilitando a troca de isotipo das imunoglobulinas de IgM para IgG4, porém, a existência de uma correlação entre as variantes -590T e *VNTR2* do gene *IL4* e os níveis séricos de IgG4 patogênica ainda não foi investigada.

6.4 Haplótipos de *IL13* e *IL4*

Tanto IL-13 quanto IL-4 são moléculas secretadas pelas células T tipo Th2 e compartilham atividades biológicas. IL-13 atua em conjunto com outras citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-9, na regulação da resposta Th2 contra patógenos extra- e intra-celulares. Os genes destas citocinas estão localizados na região 5q31-q33, formando o agrupamento conhecido como o de citocinas do tipo Th2. Dentre estas citocinas, apenas IL-4 e IL-13 são capazes de iniciar a resposta do tipo Th2 no hospedeiro e, ambas sustentam e regulam a produção de IgE pelas células B.

Observa-se que nos haplótipos de pares de sítios polimórficos de *IL4* e *IL13*, que apresentaram associação positiva com PF, os alelos de *IL4 VNTR 2* e *IL4 -590 T* estavam incluídos, os mesmos que na análise individual estavam associados positivamente com a doença (tabela 11 e resultados de PEREIRA et al., 2004). Nos haplótipos de *IL4* e *IL13* associados negativamente com PF, o alelo *IL4 -590 C* estava presente, o mesmo que individualmente encontra-se associado negativamente com a doença (PEREIRA et al., 2004). Portanto, as associações dos haplótipos de *IL4* e *IL13* com PF são secundárias às associações já descritas para o gene *IL4*.

No estudo populacional de SAKAGAMI et al. (2004) foi detectado um número maior de haplótipos *IL13-IL4* nas populações africanas, do que naquelas não-africanas, presumivelmente em decorrência da maior diversidade da população africana. Na análise neste trabalho, dos haplótipos formados pelas variantes dos cinco sítios polimórficos, incluindo os SNPs de *IL4* e *IL13* e o VNTR de *IL4*, observamos que, com exceção do haplótipo C1CGG, todos os haplótipos mencionados apresentam frequências populacionais relativamente baixas, o que contribui para os erros de estimativas. Essa incerteza se reflete, por exemplo, nos amplos intervalos de confiança (95%) das estimativas de OR observadas nos haplótipos C1TGG em EU, e T2TAA em AF. Outro indício de que as associações observadas com haplótipos pouco frequentes podem ser devidas a efeitos de amostragem são as diferenças de tipo de associação observadas entre as subamostras (EU e AF).

O haplótipo C1CGG, além de ser o mais frequente na amostra populacional analisada, apresenta o alelo C do SNP *IL4 -590* e o alelo 1 VNTR de *IL4*, os mesmos que na análise de haplótipos de duas posições na subamostra de EU, se encontravam associados negativamente com a doença. Portanto, nesse estudo, os haplótipos de *IL4* foram mais informativos do que esses em conjunto com os haplótipos de *IL13*.

6.5 Gene *PDCDI*

Incluimos neste estudo o gene *PDCDI* por codificar uma molécula inibidora, PD-1, recentemente descrita, que pertence à família CD28. Membros desta família, que inclui CD28, CTLA-4, ICOS e PD-1, estão envolvidos nas vias de sinalização ditas secundárias e que são necessárias para a estimulação ou inibição dos linfócitos T (CHAMBERS, 2001). A interação

de PD-1 com seus ligantes (PD-1L e PD-2L), que são membros da família B7, promove sinais co-inibidores, suprimindo a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-2 e inibindo a expansão de células T. Em camundongos que não expressam o gene *PDCDI* ocorre um aumento no número de células B no baço e um aumento nas concentrações séricas de IgG3, indicando que a molécula PD-1 influencia a homeostasia de células B e que quando presente transmite sinais inibidores para as células B.

As interações entre as moléculas da família CD28 e seus ligantes são importantes na manutenção e na quebra da tolerância periférica. Devido à expressão constitutiva de PD-1 em tecidos linfóides e não linfóides, bem como a de seu ligante, PD-1L, a interação entre estas moléculas pode levar à inibição de células T em tecidos não linfóides, que são sítios em que há expressão constitutiva de PD-1L (sítios inflamatórios, no músculo cardíaco, nos rins e na pele). A interação entre PD-1 e seus ligantes limita a ativação de linfócitos B auto-reativos, pois na ausência da expressão desta molécula ocorre proliferação destes linfócitos.

Considerando a função biológica desta molécula e que no PF as manifestações clínicas coincidem com a elevação dos títulos de auto-anticorpos, investigamos se as variantes polimórficas do gene *PDCDI* estão associadas com esta doença. Foram analisados os SNPs *PDCDI* +7146 (G,A), também conhecido por PD1.3, *PDCDI* +7785 (C,T) ou PD1.5 e *PDCDI* +8737 (G,A) ou PD1.6.

Observamos que a variante PD1.3 A apresenta menor freqüência nos pacientes que nos controles em ambas as subamostras, EU e AF com valores de P ($<0,07$) próximos do limite de significância escolhido neste trabalho. Esta associação possivelmente negativa com PF na amostra total é contrária àquela observada nos estudos de NIELSEN et al. (2003), que encontraram associação positiva (OR = 1,92, P = 0,037) do alelo PD1.3 A com diabetes tipo 1 na população holandesa; e também oposta aos achados de PROKUNINA et al. (2002) que relataram associação positiva deste alelo com lupus eritematoso sistêmico em europeus e mexicanos (OR = 2,8, P = 0,005; OR = 3,5, P = 0,0009, respectivamente). Recentemente este mesmo grupo de pesquisadores relatou uma tendência à associação positiva do alelo PD1.3 A (OR = 1,18, P = 0,053) com artrite reumatóide (PROKUNINA et al., 2004).

A associação negativa entre PF e o alelo PD1.3 A é interessante de ser discutida, uma vez que, conforme o modelo proposto por PROKUNINA et al. (2002), o alelo A promove uma alteração no sítio de ligação da proteína transcricional RUNX1 com conseqüente diminuição na transcrição deste gene, o que contribuiria para a quebra da tolerância e o aparecimento de doenças auto-imunes. Nossos resultados não fornecem sustentação ao

modelo proposto, que parecia explicar de forma bem razoável o efeito deste SNP na função da molécula inibidora e na susceptibilidade a doenças auto-imunes.

Também FERREIROS-VIDAL et al. (2004) encontraram associação negativa do alelo PD1.3 A com uma doença auto-imune, o lupus eritematoso sistêmico, em pacientes do sexo feminino de várias localidades da Espanha (OR = 0,67, $P = 0,005$).

Associações, positivas em alguns estudos e negativas em outros, podem ser decorrentes de diferenças populacionais quanto aos haplótipos deste gene. Além disso, a constatação de um possível sítio de ligação da proteína RUNX1, coincidente com o SNP PD1.3, não implica necessariamente que este seja funcional *in vivo*, pois há outros sítios de ligação para o mesmo fator de transcrição, alguns deles localizados no mesmo intron do PD1.3 (FERREIROS-VIDAL et al., 2004).

Um fato relevante, quando consideramos as frequências alélicas deste gene nas populações, é que o SNP PD1.3 não é polimórfico nas populações japonesa, chinesa e afroamericana (MORI et al., 2005; KONG et al., 2005; PROKUNINA et al., 2002). Em concordância com isso, verificamos que o alelo PD1.3A é menos comum em AF que em EU. Note-se entretanto, que nas duas subamostras os valores de OR para esse alelo são inferiores a um, indicando tendência para proteção contra o PF. Porém, como a frequência deste alelo é relativamente baixa, é necessário analisar uma amostra populacional maior para atestar a associação deste SNP com PF. Além disso, a presença da variante SNP PD1.3 A em certos grupos étnicos e sua ausência em outros faz com que relembremos da importância de considerar a heterogeneidade genética e a escolha correta do grupo controle em estudos que visam dissecar o componente genético de susceptibilidade.

Nosso estudo não demonstrou haver associação entre PF e os alelos e genótipos de *PDCDI* +7785(C,T) ou PD1.5. A ausência de associação com este SNP também foi verificada para artrite reumatóide em uma população chinesa de Hong Kong (KONG et al., 2005). Entretanto, em chineses de Taiwan foram observadas associações positivas entre artrite reumatóide e o alelo PD1.5 T (OR = 3,32, $P < 10^{-5}$) e o genótipo C/T (OR = 3,52, $P < 10^{-6}$) (LIN et al., 2004). Tendo em vista os resultados distintos de associação de uma mesma doença em populações geneticamente semelhantes, a análise haplotípica pode tornar-se mais informativa que a análise individual dos alelos.

Para lupus eritematoso sistêmico, foi verificada associação negativa com o alelo PD1.6 A em euro-americanos (PROKUNINA et al., 2002), ou seja, associação oposta à

encontrada para PF no presente estudo. Verificamos que na subamostra EU, os portadores deste alelo têm maior predisposição ao aparecimento do PF.

O padrão de desequilíbrio de ligação observado em nosso estudo entre os pares de SNPs de *PDCDI* indica que há um desequilíbrio mais significativo entre PD1.3 e PD1.5 nos controles do que nos pacientes da subamostra EU.

Verificamos também que o haplótipo PD1.3G_PD1.6A está associado positivamente com a doença em EU. Estes dois SNPs estão em desequilíbrio de ligação significativo e absoluto na subamostra EU de pacientes. A associação com esse haplótipo deve ser apenas devida ao alelo PD1.6A que está associado positivamente com a doença na análise individual, enquanto que o SNP PD1.3 não está associado com PF.

Identificamos associação positiva com o haplótipo PD1.5 C_ PD1.6A em EU (OR = 2,69) a qual pode ser atribuída ao alelo PD1.6A. O desequilíbrio de ligação entre esses dois SNPs é fraco. NIELSEN et al. (2003) também identificaram fraco desequilíbrio de ligação entre esses mesmos SNPs em holandeses. Por outro lado, nossos resultados, assim como os daqueles pesquisadores, indicam forte desequilíbrio de ligação entre os SNPs PD1.3 (G, A) e PD1.5 (C, T).

Ao analisarmos haplótipos com os três SNPs do gene *PDCDI* (PD1.3_PD1.5_PD1.6) foi possível identificar, na amostra EU, a combinação GCA associada com o aumento do risco para o desenvolvimento do PF endêmico, e que o haplótipo GTA está associado negativamente com o PF endêmico na amostra afro-brasileira.

A frequência da maioria dos haplótipos é baixa, de modo, que os resultados da análise de associação são pouco informativos, a não ser para os haplótipos mais comuns. Entretanto, verifica-se, pelos valores de OR, que as diferenças entre pacientes e controles quanto ao conjunto dos haplótipos, provavelmente resultam dos SNPs individualmente. Uma possível exceção é o haplótipo GTA em AF, associado à doença de forma negativa, porém, no limiar da significância estatística ($P = 0,048$). Conclui-se, que os haplótipos de *PDCDI* não acrescentam informações que não aquelas fornecidas pelos três SNPs analisados individualmente.

Este é o primeiro estudo a analisar um polimorfismo do microsatélite presente no intron 4 de *PDCDI*. Este microsatélite é pouco polimórfico nos quatro grupos étnicos analisados: orientais, caucasóides, negróides e ameríndios. É possível que o baixo número de alelos nesta posição seja decorrente da importância do número de repetições durante a recomposição do RNA mensageiro. Sugerimos seqüenciamento do segmento de DNA em que

este microssatélite está localizado, a fim de determinarmos o número correto de repetições nos alelos encontrados, pois não há estudos publicados sobre diversidade desta posição.

6.6 Interação gênica

A doença PF é decorrente da combinação de vários fatores exógenos e endógenos, entre os quais o genético tem grande influência. Dentre estes fatores, os genes *HLA* são os que apresentam maior impacto sobre a susceptibilidade ao PF, como verificado pelos valores de OR (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989; PAVONI et al., 2003).

O produto do gene *HLA-DRB1* é uma glicoproteína de membrana responsável por apresentar peptídeos de origem exógena para linfócitos T auxiliares. Esta função biológica é extremamente importante para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Resultados do estudo de PAVONI et al. (2003), realizado em parte da amostra utilizada nesse estudo, serviram como referência para classificação dos genótipos de *HLA-DRB1* conforme o fenótipo conferido: de susceptibilidade, de proteção e de neutralidade.

Neste estudo, ao aumentarmos a amostra para *HLA-DRB1* e considerando a classificação fenotípica de PAVONI et al. (2003), confirmamos as associações com PF descritas anteriormente e verificamos que o impacto individual dos fenótipos deste gene no que se refere à probabilidade de manifestação do PF, é de 31,0%. Este resultado reflete a importância da diversidade deste gene na susceptibilidade/resistência ao PF e está em consonância com os valores elevados de OR, altamente significativos, encontrados nas análises de associação entre PF e *HLA-DRB1*.

Uma das limitações da análise de regressão logística é a necessidade de um grande número de indivíduos tipificados para todas as variantes sob análise. Dentre as alternativas encontradas neste estudo, optamos pela execução de análises estratificadas entre os genes cuja análise de associação individual com PF mostrou-se significativa ou próxima ao limiar de significância ($P < 0,10$).

As análises estratificadas de *HLA-DRB1* e *IL4 -590* demonstraram uma possível aditividade dos efeitos destes genes. O grupo de indivíduos com o fenótipo de susceptibilidade de *HLA-DRB1* apresentava maior risco de manifestar a doença PF quando concomitantemente com o genótipo T/T de *IL4 -590*. O efeito de susceptibilidade do genótipo T/T de *IL4 -590* mesmo no estrato neutro de *HLA-DRB1* permite-nos levantar a

hipótese de que as moléculas HLA estimulariam os clones de células T auto-reativos e que o estímulo mais pronunciado da citocina IL-4, devido ao genótipo T/T deste gene, levaria à diferenciação desses clones em células Th2 auto-reativas. Provavelmente, o genótipo VNTR 2/2 também promoveria um aumento na produção de IL-4 e contribuiria para ativação dos clones T auto-reativos. Na presença do alelo *IL4 -590C* e/ou do alelo *VNTR1*, a menor concentração de IL-4 não permitiria a esses mesmos clones ultrapassarem o limiar de ativação.

Considerando que um conjunto de fatores deva estar ocorrendo para que o pênfigo se estabeleça, verificamos que na presença do fenótipo susceptível, conferido por *HLA-DRB1*, há um efeito epistático de PD1.3A, garantindo aos indivíduos portadores deste alelo e do fenótipo de susceptibilidade de *HLA-DRB1* uma relativa proteção contra a doença, apesar da presença de alelos *HLA-DRB1* associados positivamente ao PF. Entretanto, o alelo PD1.3A apresenta baixa frequência, o que dificulta análise estatística, não permitindo que esta seja conclusiva. Assim, recomendamos aumentar o tamanho amostral para que seja possível verificar se o SNP PD1.3 interfere na susceptibilidade ao PF e se o mesmo interage com outros genes.

Segundo nossos dados, o gene *PDCDI* ou algum gene ligado da região cromossômica 2q37, está propiciando uma relativa proteção contra o PF em indivíduos com genótipos de susceptibilidade de *HLA-DRB1*. Sugerimos intensificar a busca de genes de susceptibilidade na região cromossômica 2q33-37, uma vez que nesta região estão presentes genes que codificam moléculas co-estimuladoras e co-inibidoras de células T e B, tais como CD28, CTLA-4, ICOS e PD-1, as quais podem apresentar relevância na patogênese do PF (CHAMBERS, 2001; OKAZAKI, IWAI e HONJO, 2002).

A heterogeneidade genética presente entre as duas subamostras não permitiu verificar o efeito do polimorfismo VNTR de *IL4* na susceptibilidade/proteção ao PF realizado nas análises de regressão logística com a amostra total deste trabalho. Contudo os resultados obtidos para o *IL4 -590* podem ser considerados para VNTR, devido ao forte desequilíbrio de ligação entre estes polimorfismos. Verificamos que o impacto individual dos fenótipos deste gene no que se refere à probabilidade de manifestação do PF, é de 2,1%.

O modelo de interação encontrado para PF a partir da análise de regressão logística revela que os efeitos principais e significativos são devidos aos fenótipos de *HLA-DRB1*, genótipos de *IL4 -590* e da interação entre PD1.3 e *IL4 -590*. Considerando a interação entre estes dois genes, verificamos na análise estratificada, que os indivíduos portadores do alelo A

de PD1.3 apresentam proteção contra o PF, desde que possuam também o genótipo C/T de *IL4 -590*. Apesar da baixa frequência do alelo PD1.3 A, este parece exercer efeitos opostos (susceptibilidade X proteção) conforme o genótipo de *IL4 -590*.

Em função dos nossos resultados e das funções das moléculas envolvidas, é possível levantar hipótese que o genótipo T/T de *IL4* e genótipo G/G de PD1.3 predisponham maior susceptibilidade ao PF pelos motivos expostos a seguir. O aumento na expressão de IL-4 (genótipo *IL4 -590* T/T) favoreceria a diferenciação dos clones de células T CD4+ precursoras auto-reativa. Ao mesmo tempo, com genótipo G/G resultaria em menor intensidade de sinais inibidores da molécula PD-1 permitindo, deste modo, o desenvolvimento de um quadro auto-reativo. Porém, na presença do alelo A de PD1.3 e dos genótipos C/T de *IL4*, ocorreria a ativação mais eficaz da fosforilação de STAT6 das células T e conseqüente inativação destas células. Segundo BENNETT et al. (2003) a fosforilação desta proteína impede a reversão do processo de inativação mantido por PD-1 nestas células T, impedindo sua proliferação.

Desta forma, PD-1 poderia contribuir para a manutenção da tolerância periférica, mesmo ocorrendo a apresentação de auto-antígenos pelas células apresentadoras aos linfócitos T restritos por moléculas HLA-DR de susceptibilidade. Entretanto, a inibição pela molécula PD-1 só seria obtida se ocorresse uma conjunção de fatores que favorecessem este quadro: a ação dos diversos tipos de sinais secundários, o perfil de citocinas produzidas e as vias de sinalização ativadas nas células T e B. Entre estes fatores, a IL-6 poderia favorecer a inibição de células T autoreativas pela molécula PD-1. Neste modelo hipotético, na ausência desta citocina não haveria intensificação dos processos inflamatórios na epiderme, que poderiam opor-se aos efeitos inibidores da molécula PD-1, reduzindo a probabilidade de progressão do processo patogênico do PF.

Não observamos a existência de interação entre os genótipos de *IL4R* e o genótipo de *IL4 -590*, no que se aplica à susceptibilidade à doença. Verificamos apenas o efeito individual do genótipo T/T *IL4 -590*, pois independente dos genótipos de *IL4R*, havia aumento na susceptibilidade ao PF, o mesmo efeito observado na análise individual deste genótipo de *IL4 -590* (PEREIRA et al., 2004). A ausência de interação entre os genótipos de *IL13* e *IL4R* em nosso estudo é contrária aos resultados de HOWARD et al. (2002), que encontraram interação entre os genes *IL4R* e *IL13* na determinação do aumento nos níveis de IgE no soro e maior susceptibilidade à asma.

6.7 Mecanismos subjacentes às associações

Considerando os resultados de interação gênica encontrados neste estudo, propomos um modelo que explica o desenvolvimento do PF, no que se refere à participação dos genes já investigados.

Variantes do gene *HLA-DRB1* considerados neutros e de susceptibilidade quanto à predisposição ao PF, poderiam codificar moléculas HLA de classe II que estimulariam os clones de células T auto-reativos. Nos indivíduos com genótipo T/T no gene *IL4 -590*, haveria maior produção de IL-4, que estimularia a diferenciação dos clones auto-reativos de células T em células Th2 efectoras, desencadeando a resposta auto-imune. As células B auto-reativas estimuladas por esta citocina trocariam de isotipos de imunoglobulinas, preferencialmente para auto-anticorpos da classe IgG4. Aparentemente, o efeito do genótipo de *IL4 -590* é mais pronunciado no fenótipo *HLA-DRB1* susceptível do que no neutro (figura 2).

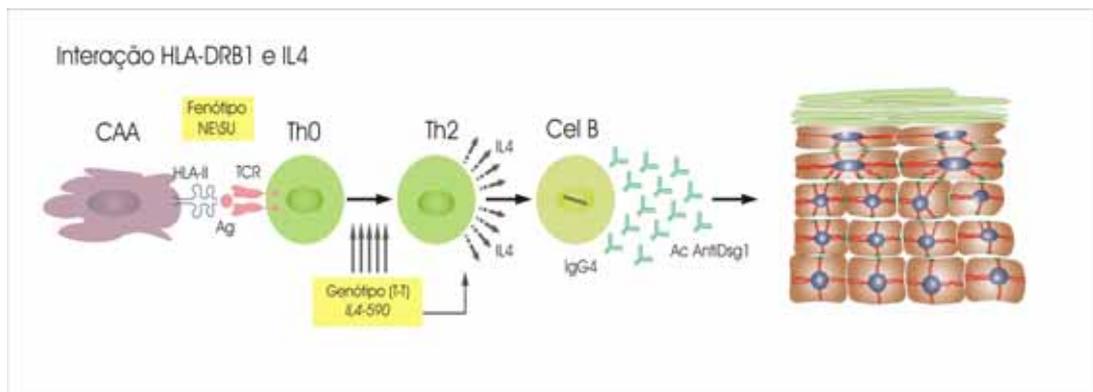


FIGURA 2: INTERAÇÃO *HLA-DRB1* E *IL4-590*. Design gráfico por Milena Muller.

Apesar dos nossos resultados não serem conclusivos quanto à interação dos genes *IL4 -590* e *HLA-DRB1* com o gene PD1.3, devido principalmente à baixa frequência de seu alelo A, levantamos algumas hipóteses que podem nortear os futuros trabalhos referentes a este tema.

A molécula PD-1 tem um importante papel na manutenção da tolerância nos sítios não linfóides periféricos. Quando um indivíduo apresentasse o alelo A (genótipos G/A e talvez, A/A) do gene PD1.3, poderia ocorrer a inibição dos clones de células T auto-reativos

presentes na periferia, mesmo quando estes reconhecessem peptídeos do auto-antígeno associados a moléculas *HLA-DRB1* de susceptibilidade (figura 3).

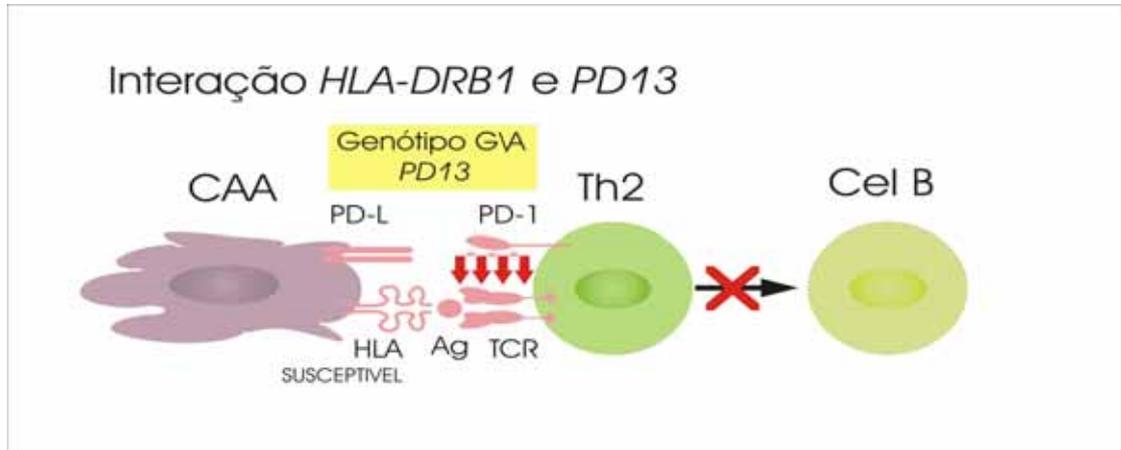


FIGURA 3: INTERAÇÃO *HLA-DRB1* E PD1.3. Design gráfico por Milena Muller.

Aparentemente, a presença do alelo A de PD1.3 promoveria inibição de célula T, mesmo na presença de maior quantidade de citocina IL-4, decorrente do alelo T de *IL4 -590*. Podemos supor que o alelo A de PD1.3 se opõe ao efeito de susceptibilidade aumentada conferida pelo alelo T de *IL4 -590*. Desta forma, as células T auto-reativas não se diferenciariam em células efetoras, prevenindo a resposta auto-imune patogênica (figura 4).

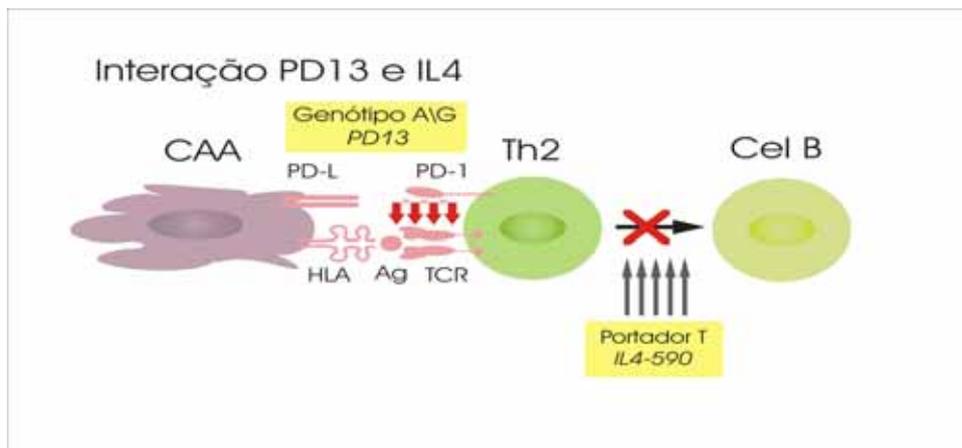


FIGURA 4: INTERAÇÃO PD1.3 E *IL4*. Design gráfico por Milena Muller.

Aparentemente a maior expressão de *IL4* favoreceria a diferenciação dos clones de células T CD4+ precursoras auto-reativas. Simultaneamente a presença do genótipo G/G do gene PD1.3 promoveria menor intensidade de sinais inibidores da molécula PD.1 permitindo o desenvolvimento de um quadro auto-reativo (figura 5).

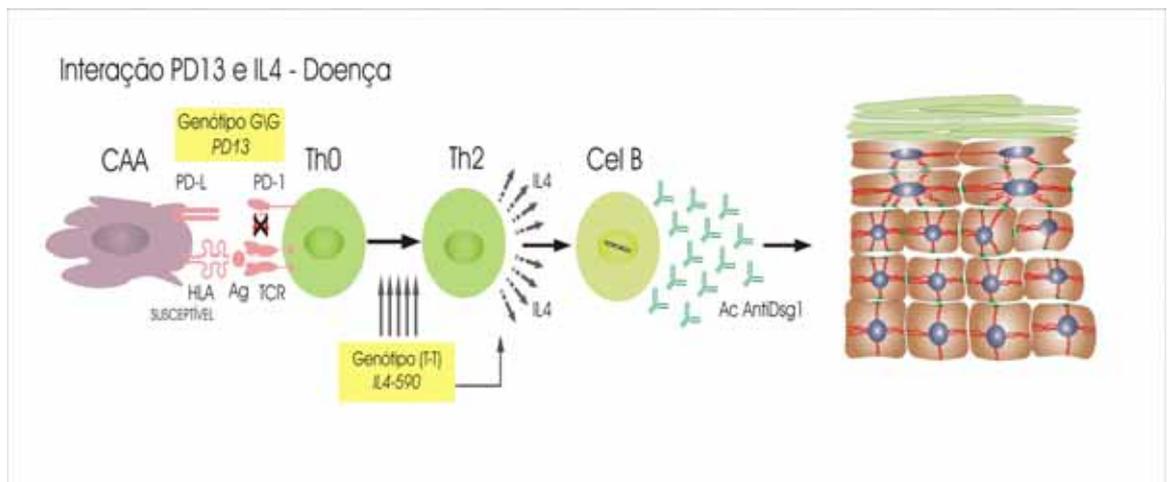


FIGURA 5: INTERAÇÃO PD1.3 E *IL4* E DOENÇA. Design gráfico por Milena Muller.

7. Conclusões

- Neste trabalho descreve-se pela primeira vez o alelo *IL4 VNTR4*, com uma única unidade de repetição de 70pb, encontrado em três indivíduos, sendo dois deles constituintes da subamostra AF e o outro restante da subamostra EU.
- Ausência de associação entre PF e os SNPs de *IL13 -1111*, *+2044*, *+2525* e *PDCD1 +7785* (PD1.5).
- Associações positivas entre PF e presença do alelo *IL4 VNTR2*, genótipos VNTR 1/2 e VNTR 2/2, haplótipos *IL4-590T_VNTR2* e *IL4-590T_VNTR1* e também entre PF e o alelo *PDCD1 +8737A* (ou PD1.6 A) e o genótipo PD1.6 A/G na subamostra EU.
- Associações negativas entre PF e o estado de portador do alelo *IL4 VNTR1* nas subamostras EU e AF e com o haplótipo *IL4-590C_VNTR1* e o alelo *PDCD1 +8737G* (PD1.6 G) na subamostra EU.
- Associações entre PF e os haplótipos de *IL13_IL4* provavelmente devam-se apenas às variantes de *IL4 -590* e de *IL4 VNTR* ou de outro loco em forte desequilíbrio de ligação com estes sítios polimórficos.
- Forte desequilíbrio de ligação entre as variantes de *IL4 -590* e de *VNTR*, impossibilitando determinar a associação primária com PF.
- Possível associação negativa (não significativa estatisticamente) entre o alelo *PDCD1 +7146A* (PD 1.3 A) e PF na amostra total.
- O polimorfismo do gene *HLA-DRB1* tem um grande impacto na manifestação da doença PF (31,0%) e os genótipos de *IL4* contribuem com 2,1% na doença.
- Interações que aumentam a susceptibilidade ao PF: o genótipo T/T *IL4 -590* na presença do fenótipo neutro de *HLA-DRB1* (OR = 3,16), o genótipo G/G de PD1.3 na presença do genótipo T/T de *IL4 -590* (OR = 2,55).
- Interações que conferem proteção contra o PF: alelo PD1.3 A tem efeito epistático sobre o fenótipo de susceptibilidade de *HLA-DRB1* (OR = 0,24); portador do alelo A de PD1.3 na presença do genótipo C/T de *IL4 -590* (OR = 0,15).
- Ausência de interação significativa entre os genótipos *IL6-174* e PD1.3 e entre *IL4R* e *IL4 -590*; associações com PF decorrem apenas do genótipo C/C do SNP *IL6 -174* e do genótipo T/T *IL4 -590*.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders Text and Review Series, 1997, 494 p.

ADAMS, M. J.; REICHEL, M. B.; KING, I. A.; MARSDEN, M. D.; GREENWOOD, M. D.; THIRLWELL, H.; ARNEMANN, J.; BUXTON, R. S.; ALI, R. R. Characterization of the regulatory regions in the human desmoglein genes encoding the pemphigus foliaceus and vulgaris antigens. **Biochemical Journal**, v. 329, p. 165-174, 1998.

AMAGAI, M.; KARPATI, S.; PRUSSICK, R.; KLAUS-KOVTUN, V.; STANLEY, J. R. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 3, p. 919-926, 1992.

AMAGAI, M.; TSUNODA, K.; ZILLIKENS, D.; NAGAI, T.; NISHIKAWA, T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, p.167-170, 1999.

ANDRADE, F. M. **Interação entre fatores genéticos e hábitos de vida na determinação de níveis de HDL-C e risco de doença coronariana na população de Porto Alegre**. Porto Alegre, 2003. 195 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ANHALT, G. J. Autoantibodies and cell-to-cell detachment in pemphigus. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 111, p. 28-34, 1988.

ANHALT, G. J.; KIM, S.; STANLEY, J. R.; KORMAN, N. J.; JABS, D. A.; KORY, M.; IZUMI, H.; RATRIE, H.; MUTASIM, D.; ARISS-ABDO, L.; LABIB, R. S. Paraneoplastic Pemphigus: an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 25, p. 1729-1735, 1990.

ANHALT, G. J.; LABIB, R. S.; VOORRHEES, J. J.; BEALS, T. F.; DIAZ, L. A. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. **New England Journal of Medicine**, v. 306, p. 1189-1196, 1982.

ANHALT, G. J.; TILL, G. O.; DIAZ, L. A.; LABIB, R. S.; PATEL, H. P.; EAGLSTEIN, N. F. Defining the role of complement in experimental pemphigus in mice. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 2835-2840, 1986.

ARAI, N.; NOMURA, D.; VILLARET, D.; DeWAAL MALEFIJT, R.; SEIKI, M.; YOSHIDA, M.; MINOSHIMA, S.; FUKUYAMA, R.; MAEKAWA, M.; KUDOH, J.; SHIMIZU, N.; YOKOTA, K.; ABE, E.; YOKOTA, T.; TAKEBE, Y.; ARAI, K. Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human *IL4* and its expression. **Journal of Immunology**, v. 142, p. 274-282, 1989.

ARANHA CAMPOS, J. **Pênfigo Foliáceo (fogo selvagem)**. Aspectos clínicos e epidemiológicos. São Paulo: Melhoramentos, 1942.

ARIMA, K.; SUYAMA, U.; SAKAHATA, Y.; AKAWAI, M.; MAO, X. Q.; ENOMOTO, T. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. 980-987, 2002.

ARNOLD, B.; ALFERINK, J.; LIMMER, A.; TAFURI, A.; HÄMMERLING, G. J. Reversal of peripheral T-cell tolerance: implications for autoimmunity. In: SVEJGAARD, A.; BUUS, S.; FUGGER, L. (Ed). **HLA and diseases – the molecular basis**. Copenhagen: Munksgaard, 1997.

BADLEY, A. D.; DOCKRELL, D.; SIMPSON, M. Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. **Journal of Experimental Medicine**, v.185, p. 55-64, 1997.

BARKER, C. F.; BILLINGHAM, H. E. Immunologically privileged sites. **Advances in Immunology**, v. 25, p. 1-54, 1977.

BEDNARCZUK, T.; PLACHA, G.; JAZDZEWSKI, K.; KURYLOWICZ, A.; KLOZA, M.; MAKOWSKA, U.; HIROMATSU, Y.; NAUMAN, J. Interleukine-13 gene polymorphisms in patients with Graves' disease. **Clinical Endocrinology**, v.59, p.519-525, 2003.

BENNETT, F.; LUXENBERG, D.; LING, V.; WANG, I. W. ; MARQUETTE, K. ; LOWE, D. ; KHAN, N. ; VELDMAN, G.; JACOBS, K. A.; VALGE-ARCHER, V. E.; COLLINS, M.; CARRENO, B.M. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 711-718, 2003.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Autoimmunity: the pathogen connection. **Nature**, v. 394, p. 227-228, 1998.

BEUTNER, E. H.; PRIGENZI, L. S.; HALE, W.; LEME, C. A.; BIER, O. G. Immunofluorescent studies of autoantibodies to intercellular areas of epithelia in Brazilian pemphigus foliaceus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 127, p. 81-86, 1968.

BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A. Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotides probes (SSOP). In: CHARRON, D. (ed). **HLA-Genetic diversity of HLA: functional and medical implication**. Paris: EDK, 1997.

BROWN, J. A.; DORFMAN, D. M.; FENG-RONG, M.; SULLIVAN, E. L.; MUNOZ, O.; WOOD, C. R.; GREENFIELD, E. A.; FREEMAN, G. J. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **Journal of Immunology**, v.170, p. 1257-66, 2003.

BUCHS, N.; SILVESTRI, T.; GIOVINE, F. S.; CHABAUD, M.; VANNIER, E.; DUFF, G. W.; MIOSSEC, P. *IL4* VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection gainst destruction. **Rheumatology**, v. 39, p. 1126-1131, 2000.

BUER, J.; LANOUE, A.; FRANZKE, A.; GARCIA, C.; VON BOCHMER, H.; SARUKHAN, A. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, p. 177-183, 1998.

BUGAWAN, T. L.; MIREL, D. B.; VALDES, A. M.; PANELO, A.; POZZILLI, P.; ERLICH, H. A. Association and interaction of the IL4R, IL4, and IL13 loci with type 1 diabetes among Filipinos. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 1505-1514, 2003.

CAPRONI, M.; GIOMI, B.; CARDINALI, E.; SALVATORE, E.; PESTELLI, E.; D'AGATA, A.; BIANCHI, B.; FABBRI, P. Further support for a role for Th2-like cytokines in blister formation of pemphigus. **Clin Immunol**, v.98, p.264-271, 2001.

CARTER, L. L.; FOUSER, L. A.; JUSSIF, J.; FITZ, L.; DENG, B.; WOOD, C.R.; COLLINS, M.; HONJO, T.; FREEMAN, G. J.; CARRENO, B. M. PD-1: PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. **European Journal of Immunology**, v. 32, p. 634-643, 2002.

CELEDON, J.C.; SOTO-QUIROS, M.E.; PALMER, L.J.; SENTER, J.; MOSLEY, J.; SILVERMAN, E.K.; WEISS, S.T.; Lack of association between a polymorphism in the interleukin-13 gene and total serum immunoglobulin E level among nuclear families in Costa Rica. **Clinical and Experimental Allergy**, v.30, p.387-390, 2002.

CERNA, M.; FERNANDEZ-VIÑA, M.; FRIEDMAN, H.; MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; DIAZ, L. A.; STASTNY, P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Xavante indians. **Tissue Antigens**, v. 42, p. 138-140, 1993.

CHAMBERS, C.A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. **Trends in Immunology**, v.22, n.4, p.217-223, 2001.

CHEN, W.; ERIKSEN, M. B.; LEVIN, L. S.; HERSHEY, G. K. K. Functional effect of the R110Q IL13 genetic variant alone and in combination with IL4RA genetic variants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, p. 553-560, 2004.

CHIARAMONTE, M. G.; MENTINK-KANE, M.; JACOBSON, B. A.; CHEEVER, A. W.; WHITTERS, M. J.; GOAD, M. E. P.; WONG, A.; COLLINS, M.; DONALDSON, D. D.; GRUSBY, M. J.; WYNN, T. A. Regulation and function of the interleukin 13 receptor $\alpha 2$ during a T helper cell type 2-dominant immune response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 687-701, 2003.

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W. P.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D. D.; CHRISTIANSEN, J. A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H. M.; SAVELKOUL, H. F. J.; FINKELMAN, F. D.; BOND, M. W.; MOSSMANN, T. R. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunological Reviews**, v. 102, p.1-28, 1988.

CRESWELL, S. N.; BLACK, M. M.; BHOGAG, G.; SKEETE, M. V. H. Correlation of circulating intercellular antibody titers in pemphigus with disease activity. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 6, p. 477-483, 1981.

D'AURIA, L.; MUSSI, A.; BONIFATI, C.; D'AGOSTO, G.; DE SIMONE, C.; GIACOLONE, B.; FERRARO, C.; AMEGLIO, F. Cytokines in the sea of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. **European Cytokine Network**, v. 8, p. 383-387, 1997.

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; HANZ-FILHO, G.; BORGES, P.; CHAUL, A.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; LABIB, R. S.; ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II Current and Historic epidemiologic studies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, p. 4-12, 1989.

EATON, D. P.; DIAZ, L. A.; HANS-FILHO, G.; SANTOS, V. D.; AOKI, V.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E. A.; SAMPAIO, S. A.; GOTTLIEB, M. S.; GIUDICE, G. J.; LOPEZ, A.; CUPP, E. W. Comparison of black fly species (Diptera Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease free sites in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 120-131, 1998.

ESPAÑA, A.; DIAZ, L. A.; MASCARO Jr, 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, p. 83-89, 1997.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** (in press). Disponível em <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>> Acesso em 17 ago. 2005.

FELICIANI, C.; TOTO, P.; AMERIO, P. A.; AMERIO, P. In vitro C3 mRNA expression in pemphigus vulgaris: complement activation is increased by IL-1 α and TNF- α . **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 3, p. 140, 1999.

FELICIANI, C.; TOTO, P.; AMERIO, P.; POUR, S. M.; COSCIONE, G.; SHIVJI, G.; WANG, B.; SAUDER, D. N. In vitro and in vivo expression of interleukin 1-a and tumor necrosis factor- α mRNA in pemphigus vulgaris: Interleukin-1a and tumor necrosis factor- α are involved in acantholysis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, p. 71-77, 2000.

FERREIROS-VIDAL, I.; GOMEZ-REINO, J. J.; BARROS, F.; CARRACEDO, A.; CARREIRA, P.; GONZALEZ-ESCRIBANO, F.; LIZ, M.; MARTIN, J.; ORDI, J.; VICARIO, J. L.; GONZALEZ, A. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v.50, p.2590-2597, 2004.

FINGER, L. R.; PU, J.; WASSERMAN, R.; VIBHAKAR, R.; LOUIE, E.; HARDY, R. R.; BURROWS, P. D.; BILLIPS, L. G. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. **Gene**, v. 197, p. 177-87, 1997.

FREEMAN, G. J.; LONG, A. J.; IWAI, Y.; BOURQUE, K.; CHERNOVA, T.; NISHIMURA, H.; FITZ, L. J.; MALENKOVICH, N.; OKAZAKI, T.; BYRNE, M. C.; HORTON, H. F.; FOUSSER, L.; CARTER, L.; LING, V.; BOWMAN, M. R.; CARRENO, B. M.; COLLINS, M.; WOOD, C. R.; HONJO, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 1027-1034, 2000.

FUTAMURA, S.; MARTINS, C. R.; RIVITTI, E. A.; LABIB, R. S.; DIAZ, L. A.; ANHALT, G. J. Ultrastructural studies of acantholysis induced in vitro by passive transfer of IgG from endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 93, p. 480-485, 1989.

GRAVES, P. E.; KABESCH, M.; HALONEN, M.; HOLBERG, C. J.; BALDINI, M.; FRITZSCH, C.; WEILAND, S. K.; ERICKSON, R. P.; VON MUTIUS, E.; MARTINEZ, F. D. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL 13 gene is associated with total serum IgE levels in the three populations of white children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 506-513, 2000.

GRUNIG, G.; de VRIES, J.E.; MALEFYT, R.W. Interleukin-13. In. THOMSON, A.W.; LOTZE, M.T. **The Cytokine Handbook**. 4th edition, 2003.

GUILHERME, L.; CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; SNITCOWSKI, R.; POMERANTZEFF, P. M. A.; ASSIS, R. V.; PEDRA, F.; NEUMANN, J.; GOLDBERG, A.; PATARROYO, M. E.; PILLEGI, F.; KALIL, J. Human heart- infiltrating T cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. **Circulation**, v.92, p.415-420, 1995.

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

HAHNE, M.; RIMOLDI, D.; SCHOTER, M. Melanoma cell expression of Fas (apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. **Science**, v. 274, p. 1363-1366, 1996.

HAMMER, J.; GALLAZZI, F.; BONO, E.; KARR, R. W.; GUENOT, J.; VALSASNINI, P.; NAGY, Z. A.; SINIGAGLIA, F. Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 1847-1855, 1995.

HASHIMOTO, T. Immunopathology of IgA pemphigus. **Clinics in Dermatology**, v.19, p.638-689, 2001.

HE, J.Q.; CONNETT, J.E.; ANTHONISEN, N.R.; SANDFORD, A.J. Polymorphisms in the IL13, IL13RA1, and IL4RA genes and rate of decline in lung function in smokers. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.28. p.379-385, 2003.

HEINZMANN A.; JERKIC, S.P.; GANTER, K.; KURZ, T.; BLATTMENN, S.; SCHUCHMANN, L.; GERHOLD, K.; BERNER, R.; DEICHMANN, K.A. Association study of the IL13 variant Arg110Gln in atopic diseases and juvenile idiopathic arthritis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, October, p.735-739, 2003.

HEINZMANN, A.; MAO, X. Q.; AKAIWA, M.; KREOMER, R. T.; GAO, P. S.; OHSHIMA, K.; UMESHITA, R.; ABE, Y.; BRAUN, S.; YAMASHITA, T.; ROBERTS, M. H.; SUGIMITI, R.; ARIMA, K.; ARINOBU, Y.; YU, B.; KRUSE, S.; ENIOMETO, T.; DEKA, T.; KEWAI, M.; SHIMAZU, S.; SASAKI, S.; ADRA, C. N.; KITAICHI, M.; INOUE, H.; YAMAGUCHI, K.; TOMICHI, N.; KURIMOTO, F.; HAMASAKI, N.; HOPKIN, J. M.; IZUHARA, K.; SHIRAKAWA, T.; DEICHMANN, K. A. Genetic variants of IL13 signalling and human asthma and atopy. **Human Molecular Genetics**, v. 9, p. 549-559, 2000.

HIROMATSU, Y.; FUKUTANI, T.; ICHIMURA, M.; MUKAI, T.; KAKU, H.; NAKAYAMA, H.; MIYAKE, I.; SHOJI, S.; KODA, Y.; BEDNARCZUK, T. Interleukin-13 gene polymorphisms confer the susceptibility of Japanese populations to Grave's disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, p. 296-301, 2005.

HOSMER, D.W. & LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1989.

HOWARD, T. D.; KOPPELMAN, G. H.; XU, J.; ZHENG, S. L.; POSTMA, D. S.; MEYERS, D. A.; BLEECKER, E. R. Gene-gene interaction in asthma *IL4RA* and *IL13* in a Dutch population with asthma. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, p. 230-236, 2002.

HOWARD, T. D.; WHITTAKER, P. A.; ZAIMAN, A. L.; KOPPELMAN, G. H.; XU, J.; HANLEY, M. T.; MEYERS, D. A.; POSTMA, D. S.; BLEECKER, E. Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. **American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology**, v. 25, p. 377-384, 2001.

HSIEH, C. S.; HEIMBERGER, A. B.; GOLD, S.; TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, p. 547-549, 1993.

HUMMELSHOJ, T.; BODTGER, U.; DATTA, P.; MALLING, H.J.; OTURAI, A.; POULSEN, L.K.; RYDERM L.P.; SORENSEN, P.S.; SVEJGAARD, E.; SVEJGAARD, A. Association between an interleukin-13 promoter polymorphism and atopy. **European Journal of Immunogenetics**, v.30, p.355-359, 2003.

IWAI, Y.; ISHIDA, M.; TANAKA, Y.; OKAZAKI, T.; HONJO, T.; MINATO, N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p.12293-97, 2002.

KAMRADT, T.; MITCHISON, N. A. Tolerance and autoimmunity. **Advances in Immunology**, v. 344, p. 655-664, 2001.

KAWANA, S.; DIAZ, L. A.; RIVITTI, E. A.; GEOGHEGAN, W. D.; JORDON, R. E. Complement fixation by Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 71, p. 464-469, 1988.

KELLY-WELCH, A. E.; HANSON, E. M.; BOOTHBY, M. R.; KEEGAN, A. D. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. **Science**, v. 300, p. 1527-1528, 2003.

KLEINBAUM, D.G. **Logistic Regression: a self-learning text**. New York: Springer-Verlag, 1994.

KOCH, P. J.; MAHONEY, M. G.; ISHIKAWA, H.; PULKKINEN, L.; UITTO, J.; SHULTZ, L.; MURPHY, G. F.; WHITAKER-MENEZES, D.; STANLEY, J. R. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. **Journal of Cellular Biology**, v. 137, p. 1091-1102, 1997.

KONG, E.K.P.; PROKUNINA-OLSSON, L.; WONG, W.H.S.; LAU, C.S.; CHAN, T.M.; ALARCON-RIQUELME, M.; LAU, Y.L. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong chinese. **Arthritis & Rheumatism**, v.52, n.4, p.1058-1062, 2005.

KERSH, G.; ALLEN, P.M. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. **Nature**, v.380, p.495-498, 1996.

KRONER, A.; MEHLING, M. HEMMER, B. RIECKMANN, P.; TOYKA, K.V.; MAURER, M.; WIENDL, H. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v.58, p.50-57, 2005.

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

LATCHMAN, Y.; WOOD, C. R.; CHERNOVA, T.; CHAUDHARY, D.; BORDE, M.; CHERNOVA, I.; IWAI, Y.; LONG, A. J.; BROWN, J. A.; NUNES, R.; GREENFIELD, E. A.; BOURQUE, K.; BOUSSIOTIS, V. A.; CARTER, L. L.; CARRENO, B. M.; MALENKOVICH, N.; NISHIMURA, H.; OKAZAKI, T.; HONJO, T.; SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nature Immunology**, v. 2, p. 261-268, 2001.

LAUNDY, G. J.; SPINK, C. F.; KEEN, L. J.; WOOD, N. A. P.; BIDWELL, J. L. A novel polymorphism in the human interleukin-13 (*IL13*) promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v. 27, p. 53-54, 2000.

LEWONTIN, R. C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. **Genetics**, v. 49, p.49-67, 1964.

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). **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 11, p. 1501-1510, 2003.

LI, N.; LIU, Z.; DIAZ, L. A. Pemphigus foliaceus autoantibodies recognize two dominant pathogenic epitopes located in EC1 and Ec2 domains of Desmoglein-1. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 1, p. 305, 2002.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUCK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL-3) and IL-4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 19, p. 1227-1232, 1989.

LIN, M. S.; FU, C. H.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E. A.; MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; LAZARO, A. M.; GIUDICE, G. J.; STASTNY, P.; DIAZ, L. A. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 207-213, 2000.

LIN, M. S.; SWARTZ, S. J.; LOPEZ, A.; DING, X.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A.; VINY, P.; FAIRLEY, J. A.; DIAZ, L. A. Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 31-40, 1997.

LIN, S.C.; YEN, J.H.; TSAI, J.J.; OU, T.T.; LIU, H.W.; CHEN, C.J. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v.50, n.3, p.770-775, 2004.

LIU, X.; NICKEL, K. A.; BEYER, K.; HUANG, S. K. An IL 13 coding region variant is associated with high total serum IgE level and atopy dermatitis in the German Multicenter Atopy Study (MAS-90). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 167-170, 2000.

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; FRIEDMAN, H.; MARTINS, C. R.; SANCHES, J. A.; CUNHA, P. R.; HOFFMAN, R. G.; DIAZ, L. A. The cooperative group on Fogo selvagem Research. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, p. 847-850, 1992.

LÓPEZ-ROBLES, E.; AVALOS-DÍAZ, E.; VEJA-MEMIJE, E.; HOJYO-TOMOKA, T.; VILLALOBOS, R.; FRAIRE, S.; DOMINGUEZ-SOTO, L.; HERRERA-ESPARZA, R. TNF- α and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. **International Journal of Dermatology**, v. 40, p. 185-188, 2001.

LÜHDER, F.; CHAMBERS, C.; ALLISON, J. P.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Pinpointing when T cell costimulatory receptor CTLA4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 12204-12209, 2000.

MARSH, D. G.; NEELY, J. D.; BREAZEALE, D. R.; GHOSH, B.; FRIEDHOFF, L. R.; EHRLICH-KAUTZY, E.; SCHOU, C.; KRISHNASWAMY, G.; BEATY, T. H. Linkage analysis of *IL4* and other chromosome 5q31.1 markers and total serum IgE concentrations. **Science**, v. 264, p. 1152-1156, 1994.

MARTEL, P.; GILBERT, D.; DROUOT, L.; PROST, C.; RAUX, G.; DELAPORTE, E.; JOLY, P.; TRON, F. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, a target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. **Genes and Immunity**, v. 2, p. 41-43, 2001.

McKENZIE, A. N.; CULPEPPER, J. A.; MALEFYT, R. W.; BRIÈRE, F.; PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; SATO, A.; DANG, W.; COCKS, B. G.; MENON, S.; VRIES, J. E. de; BANCHEREAU, J.; ZURAWSKI, G. Interleukin 13, a T cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 3735-3739, 1993.

MENTINK-KANE, M. M.; CHEEVER, A. W.; THOMPSON, R. W.; HARI, D. M.; KABATEREINE, N. B.; VENNERVALD, B. J.; OUMA, J. H.; MWATHA, J. K.; JONES, F. M.; DONALDSON, D. D.; GRUSBY, M. J.; DUNNE, D. W.; WYNN, T. A. *IL13* receptor α 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in shistosomiasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 586-590, 2004.

MESSIAS, I. T. de; VON KUSTER, L. C.; SANTAMARIA, J.; KAJDACSY-BALLA, A. Complement and antibody deposition in Brazilian pemphigus foliaceus and correlation of disease activity with circulating antibodies. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 11, p. 1664-1668, 1988.

MEYERS, D. A.; POSTMAN, D. S.; PANHUSYEN, C. I. M.; XU, J.; AMELUNG, P. J.; LEVITT, R. C.; BLEECKER, E. R. Evidence for a locus regulation total serum IgE levels mapping to chromosome 5. **Genomics**, v. 23, p. 464-470, 1994.

MILLER, M. P. R x C, A Windows[®] program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm. Disponível em <<http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm>> Acesso em 01 nov. 2005.

MINELLI, L. Pênfigo foliáceo sul-americano no Estado do Paraná, Brasil, 1941-1980. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 101, p. 114-121, 1986.

MINTY, A.; CHALON, P.; DEROCQ, J. M.; DUMONT, X.; GUILLEMOT, J. C.; KAGHAD, M.; LABIT, C.; LEPIATOIS, P.; LIAUZUN, P.; MILOUX, B.; MINTY, C.; CASELLAS, P.; LOISON, G.; LUPKER, J.; SHIRE, D.; FERRARA, P.; CAPUT, D. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**, v. 362, p. 248-250, 1993.

MORAES M. E; FERNANDEZ-VINA, M.; LAZAR, A.; DIAZ, L. A.; FILHO, G. H.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E.; AOKI, V.; STASTNY, P.; MORAES, J. R. An epitope in the third hypervariable region of DRB1 gene is involved in a susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens**, v. 49, p. 34-40, 1997.

MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; DIAZ, L. A.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T.; ALVAREZ, R. R.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E.; STASTNY, P. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**, v. 33, p. 388-391, 1991.

MORI, M.; YAMADA, R.; KOBAYASHI, K.; KAWAIDA, R.; YAMAMOTO, K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. **Journal of Human Genetics**, v.50, p.264-266, 2005.

MURPHY, K. M.; OUYANG, W.; FARRAR, J. D.; YANG, J.; RANGANATH, S.; ASNAGLI, H.; AFKARIAN, M.; MURPHY, T. L. Signaling and transcription in T helper development. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 451-494, 2000.

NELMS, K.; KEGAN, A. D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J. J.; PAUL, W. E. The *IL4* receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 701-738, 1999.

NIELSEN, C.; HANSEN, D.; HUSBY, S.; JACOBSEN, B.B.; LILLEVANG, S.T. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. **Tissue Antigens**, v.62, p.492-497, 2003.

NISHIMURA, H.; HONJO, T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. **Trends in Immunology**, v. 22, p. 265-268, 2001.

NISHIMURA, H.; OKAZAKI, T.; TANAKA, Y.; NAKATANI, K.; HARA, M.; MATSUMORI, A.; SASAYAMA, S.; MIZOGUCHI, A.; HIAI, H.; MINATO, N.; HONJO, T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. **Science**, v. 291, p. 319-322, 2001.

NOGUCHI, E.; NUKAGA-NISHIO, Y.; JIAN, Z.; YOKOUCHI, Y.; KAMIOKA, M.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; HAMAGUCHI, H.; MATSUI, A.; SHIBASAKI, M.; ARINAMI, T. Haplotypes of the 5' region of the *IL4* gene and SNPs in the intergene sequence between the *IL4* and *IL13* genes are associated with atopic asthma. **Human Immunology**, v. 62, p. 1251-1257, 2001.

NOGUCHI, E.; SHIBASAKI, M.; ARINAMI, T.; TAKEDA, K.; MAKI, T.; MIYAMOTO, T.; KAWASHIMA, T.; KOBAYASHI, K.; HAMAGUCHI, H. Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-33 in a Japanese population. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, p. 1390-1393, 1997.

OKAZAKI, T.; IWAI, Y.; HONJO, T. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 779-782, 2002.

PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, v. 76, p. 241-251, 1994.

PAVONI, D. P.; ROXO, V. M. M. S.; FILHO, A. M.; PETZL-ERLER, M. L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**, v. 4, p. 110-116, 2003.

PEREIRA, N. F.; HANSEN, J. A.; LIN, M T.; ROXO, V. M.; BRAUN, K.; PETZL-ERLER, M. L. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v.28, p. 233-241, 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, p. 408-414, 1989.

PETZL-ERLER, M.L.; MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? **Journal of Autoimmunity**, v.25, p.121-125, 2005.

PRITCHARD, M. A.; BAKER, E.; WHITMORE, S. A.; SUTHERLAND, G. R.; IDZERDA, R. L.; PARK, L. S.; COSMAN, D.; JENKINS, N. A.; GILBERT, D. J.; COPELAND, N. G.; BECKMANN, M. P. The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7. **Genomics**, v. 10, p. 801-806, 1991.

PROBST, C. M. **Convert: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos, versão 1.1.** Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, 1998.

PROKUNINA, L.; CASTILLEJP-LÓPEZ, C.; ÖBERG, F.; GUNNARSSON, I.; BERG, L.; MAGNUSSON, V.; BROOKES, A. J.; TENTLER, D.; KRISTJANSDÓTTIR, H.; GRÖNDAL, G.; BOLSTAD, A. I.; SVENUNGSSON, E.; LUNDBERG, I.; STURFELT, G.; JÖNSSON, A.; TRUEDSSON, L.; LIMA, G.; ALCOCER-VARELA, J.; JONSSON, R.; GYLLENSTEN, U. B.; HARLEY, J. B.; ALARCÓN-SEGOVIA, D.; STEINSSON, K.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. A regulatory polymorphism in PDC1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. **Nature Genetics**, v. 32, p. 666-229, 2002.

PROKUNINA, L.; PADYUKOV, L.; BENNET, A.; DE FAIRE, U.; WIMAN, B.; PRINCE, J.; ALFREDSSON, L.; KLARESKOG, L.; ALARCON-RIQUELME, M. Association of the PD-1.3D allele of the PDCD1 in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. **Arthritis & Rheumatism**, v.50, n.6, p.1770-1773, 2004.

PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; COCKS, B. G.; MCKENZIE, A. N. J.; MENON, S.; ZURAWSKI, G.; MALEFYT, R. W.; VRIES, J. E. de. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 90, p. 3730-3734, 1993.

ROCK, B.; MARTINS, C. R.; THEOFILOPOULOS, A. N.; BALDERAS, R. S.; ANHALT, G. J.; FUTAMURA, S.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 463-469, 1989.

ROSCOE, J. T.; DIAZ, L. A.; 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. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, p. 538-541, 1985.

ROSENWASSER, L.J.; FLEMM, D.J.; DRESBACK, J.K.; INAMURA, H.; MASCALI, J.J.; KLINNERT, M.; BORISH, L. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. **Clinical & Experimental Allergy**, v.25, supl. 2, p.74-78, 1995.

ROSMALLEN, J. G. M.; van EWIJK, W.; LEENEN, P. J. M. T cell education in autoimmune diabetes: teachers and students. **Trends in Immunology**, v.23, p.40-46, 2002.

ROXO, V. M. M. S. **Estudo de associação entre variantes dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1, TNF, LTA e FAS e o pênfigo foliáceo endêmico**. Curitiba, 2003. 148 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ROXO, V.M.; PEREIRA, N.F.; PAVONI, D.P.; LIN, M.T.; HANSEN, J.A.; DE O POERSCH, C.; 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, p.394-400, 2003.

SAKAGAMI, T.; WITHERSPOON, D. J.; NAKAJIMA, T.; JINNAI, N.; WOODING, S.; JORDE, L. B.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, E.; GEJYO, F.; INOUE, I. Local adaptation and population differentiation at the interleukin 13 and interleukin 4 loci. **Genes and Immunity**, on line, p. 1-9, 2004.

SALAMA, A. D.; CHITNIS, T.; IMITOLA, J.; AKIBA, H.; TUSHIMA, F.; AZUMA, M.; YAGITA, H.; SAYEGH, M. H.; KHOURY, S. J. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, p. 71-78, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2. ed., Cold Spring Harbor laboratory Press, Plainview, 1989.

SANGHERA, D.; MANZI, S.; BOMTEMPO, F.; NESTJLERODE, C.; KAMBOH, M.I. Role of na intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. **Human Genetics**, v.115, p.393-398, 2004.

SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W. E. IL-12 acts directly on CD4+T cells to enhance priming for IFN γ production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 90, p. 10188-10192, 1993.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nature Reviews**, v. 2, p. 116-26, 2002.

SHIBATA, N.; OHNUMA, T.; TAKAHASHI, T.; BABA, H.; ISHIZUKA, T.; OHTSUKA, M.; UEKI, A.; NAGAO, M.; ARAI, H. The effect of *IL4* +33C/T polymorphism on risk of Japanese sporadic Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 323, p. 161-163, 2002.

SHINOHARA, T.; TANIWAKI, M.; ISHIDA, Y.; KAWAICHI, M.; HONJO, T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). **Genomics**, v. 23, p. 704-706, 1994.

SHIRAKAWA, T.; DEICHMANN, K. A.; IZUHARA, K.; MAO, X. Q.; ADRA, C. N.; HOPKIN, J. Atopy and asthma genetic variants of *IL4* and *IL13* signalling. **Immunology Today**, v. 21, p. 60-64, 2000.

SINHA, A. A.; LOPEZ, M. T.; McDEVITT, H. O. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. **Science**, v. 248, p. 1380-1388, 1990.

SITARU, C.; ZILLIKENS, D. Mechanisms of blister induction by autoantibodies. **Experimental Dermatology**, v. 14, p.861-875, 2005.

SMIRNOV, D. V.; SMIRNOVA, M. G.; KOROBKO, V. G.; FROLOVA, E. I. Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13 resemblance in their organization. **Gene**, v. 155, p. 277-281, 1995.

SUZUKI, I.; HIZAWA, N.; YAMAGUCHI, E.; KAWAKAMI, Y. Association between a C+33T polymorphism in the *IL4* promoter region and total serum IgE levels. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 1746-1749, 2000.

SUZUKI, I.; YAMAGUCHI, E.; HIZAWA, N.; ITOH, A.; KAWAKAMI, Y. A new polymorphism in the 5' flanking region of the human interleukin (IL)-4 gene. **Immunogenetics**, v. 49, p. 738-739, 1999.

SYED, F.; PANETTIERI, R. A.; TLIBA, O.; HUANG, C.; LI, K.; BRACHT, M.; AMEGADZIE, B.; GRISWOLD, D.; LI, L.; AMRANI, Y. The effect of IL-13 and IL-13R130Q, a naturally occurring IL-13 polymorphism, on the gene expression of human airway smooth muscle cells. **Respiratory Research**, v. 6, p. 1-9, 2005.

TARAZONA-SANTOS, E.; TISHKOFF, S.A. Divergent patterns of linkage disequilibrium and haplotype structure across global populations at the interleukin-13 (IL13) locus. **Genes and Immunity**, v.5, p.53-65, 2005.

TODA., M.; ONO, S. J. Genomics and proteomics of allergic disease. **Immunology**, v. 106, p. 1-10, 2002.

TODD, J. A. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. **BioEssays**, v.21, p.164-174, 1999.

TODD, M. D.; GRUSBY, M. J.; LEDERER, J. A.; LACY, E.; LICHTMAN, A. H.; GLIMCHER, L. H. Transcription of the Interleukin-4 gene is regulated by multiple promoter elements. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1663-1674, 1993.

TSENG, S. Y.; OTSUJI, M.; GORSKI, K.; HUANG, X.; SLANSKY, J. E.; PAI, S. I.; SHALABI, A.; SHIN, T.; PARDOLL, D. M.; TSUCHIYA, H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, p. 839-45, 2001.

TUR, E.; BRENNER, S. Contributing exogenous factors in pemphigus – review. **International Journal of Dermatology**, v. 36, p. 888-893, 1997.

TUR, E.; BRENNER, S. Diet and pemphigus: in pursuit of exogenous factors in pemphigus and fogo selvagem. **Archives of Dermatology**, v. 13, p. 1406-1410, 1998.

VAN DER POUW, K.; VAN VEEN, A.; BOEIJE, L.C.M.; VAN TUYL, S.A.P.; DE GROOT, E.R.; STAPEL, S.O.; BAKKER, A.; VERWEIJ, C.L.; AARDEN, L.A.; VAN DER ZEE, J. S. An IL13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. **Genes and Immunity**, v. 1, p. 61-65, 1999.

VANNIER, E.; MILLER, L. C. ; DINARELLO, C. A. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin 4: Interleukin 4 suppress interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 89, p. 4076-4080, 1992.

VILCEK, J. The cytokines: an overview. **The Cytokine Handbook**, 4. Ed., Angus W Thomson & Michael T. Avon: Lotze editors, 2003, 1396 p.

VLADICH, F.D.; BRAZILLE, S.M.; STERN, D.; PECK, M.L.; GHITTONI, R.; VERCELLI, D. IL-12 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.3, p.747-754, 2005.

WALLEY, A. J.; WILTSHIRE, S.; ELLIS, C. M.; COOKSON, W. O. C. M. Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits. **Genomics**, v. 72, p. 15-20, 2001.

WANG, M.; XING, Z. M.; LU, C.; MA, Y. X.; YU, D. L.; YAN, Z.; WANG, S. W.; YU, L. S. A common *IL13* Arg130Gln single nucleotide polymorphism among Chinese atopy patients with allergic rhinitis. **Human Genetics**, v. 113, p. 387-390, 2003.

WARREN, S. J. P.; ARTEAGA, L. A.; RIVITTI, E. A.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; QAQISH, B. F.; LIN, M. S.; GIUDICE, G. J.; DIAZ, L. A. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 1, p. 1-5, 2003.

WARREN, S. J. P.; LIN, M. S.; GIUDICE, G. J.; HOFFMAN, 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. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 23-30, 2000.

WASCHKE, J.; BRUGGEMAN, P.; BAUMGARTNER, W.; ZILLIKENS, D.; DRENCKHAHN, D. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.11, p.3157-3165, 2005.

WATANABE, N.; GAVRIELI, M.; SEDY, J.R.; YANG, J.; FALLARINO, F.; LOFTIN, S.K.; HURCHLA, M.A.; ZIMMERMAN, N.; SIN, J.; ZANG, X.; MURPHY, T.L.; RUSSEL, J.H.; ALLISON, J.P.; MURPHY, K.M. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. **Nature Immunology**, v.4, n.7, p.670-679, 2003

WEI, C. L.; CHEUNG, W.; HENG, C. K. ; ARTY, N.; CHONG, S. S.; LEE, B. W.; PUAH, K. L.; YAP, H. K. Interleukin-13 genetic polymorphisms in Singapore Chinese children correlate with long-term outcome of minimal-change disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, p. 728-734, 2005.

WILLS-KARP, M. The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits. **Respiratory Research**, v. 1, p. 19-23, 2000.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**, v. 19, p. 251-253, 1955.

WUCHERPFENNIG, K. W.; STROMINGER, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. **Cell**, v. 80, p. 695-705, 1995.

WYNN, T. A. *IL13* Effector functions. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 425-56, 2003.

ZANELLI, E.; GONZALEZ-GAY, M. A.; DAVID, C. S. Could HLA-DRB1 be protective locus in rheumatoid arthritis? **Immunology Today**, v.16. p.274-278, 1995.

ZEOTI, D. M.; FIGUEIREDO, J. F. C.; CHIOSSI, M. P. V.; ROSELINO, A. M. F. Serum cytokines in patients with Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33., n. 9, p. 1065-1068, 2000.

ZHOU, G.; ZHAI, Y.; DONG, X.; ZHANG, X.; HE, F.; ZHOU, K.; ZHU, Y.; WEI, H.; YAO, Z.; ZHONG, S.; SHEN, Y.; QIANG, B.; HE, F. Haplotype structure and evidence for positive selection at the human *IL13* locus. **Mol Biol Evol**, v.11, n.1, p.29-35, 2004.

ZURAWSKI, S. M.; VEGA JR, F.; HUYGHE, B.; ZURAWSKI, B. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. **The European Molecular Biology Organization**, v. 12, p. 2663-2670, 1993.

8. Anexos:

8.1 Ficha de averiguação

PROJETO PÊNFIGO FOLIÁCEO= P200/CP500

Código do indivíduo _____ no. do prontuário: _____

Identificação:

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____

Município: _____ Sexo: _____ -Estado civil: _____

Grupo étnico: _____

Dia/Mês/ano do nascimento: _____ Município: _____

Município de residência atual/ próximo à: _____

Municípios onde viveu/ tempo de residência

Município onde apareceu a lesão primária: _____ Idade _____ ANO: _____

Quem/onde o encaminhou para o tratamento? _____

Ocupação: _____ Grau de Instrução _____

Tipo de Habitação: _____

Quantas pessoas vivem na habitação? _____

·Diagnóstico/classificação _____

Refere-se à outras doenças/ complicações? _____

Remédios/Quais/sempre usou? _____

Outros agentes químicos/ quando: _____

·Tratamento atual: _____

·Tratamentos anteriores: _____

Tratamento interrompido? _____

FAMÍLIA DO ENTREVISTADO:

Nome do PAI: _____

Onde ele nasceu? (Município): _____

Origem(Ascendência) do PAI: _____

Cor do pai/ semelhante à você? _____

Nome da MÃE: _____

Onde ela nasceu? (Município): _____

Origem (Ascendência) da MÃE: _____

Cor da mãe/ semelhante à você? _____

Pais são consanguíneos? _____

(nem primos distantes??) _____

Número de irmãos: _____ Todos filhos dos mesmos pais? _____ Todos vivos? _____

Ordem do nascimento: _____

Quantas x(s) engravidou? _____

Nasceram vivos? _____

Número de filhos? _____

Algum aborto (perca)? _____

Alguém mais na família com a mesma doença? _____

Caso haja fazer a genealogia dos familiares: _____

Local da averiguação: _____

DATA da averiguação: _____

Averiguador: _____

Outras observações: