

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALÉRIA BUMILLER BINI

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *FCN3* DA VIA DAS
LECTINAS DO COMPLEMENTO COM O PÊNFIGO FOLIÁCEO

CURITIBA

2015

VALÉRIA BUMILLER BINI

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *FCN3* DA VIA DAS
LECTINAS DO COMPLEMENTO COM O PÊNFIGO FOLIÁCEO

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado em Biologia (BIO028) como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Angelica Beate Winter Boldt
Co-orientadora: Drª Fabiana Antunes de Andrade

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me fortalecido e me ensinado durante esses quatro anos da faculdade. Agradeço a proteção, o consolo e o Seu incomparável amor!

A minha querida professora orientadora Angelica.

As equipes dos laboratórios LIPM e LGMH.

As Professoras Iara e Maria Luiza.

A Márcia que me ensinou a fazer PCR e eletroforese.

A minha coorientadora Fabiana.

A Universidade Federal do Paraná.

Aos pacientes e aos controles.

A todos que oraram por mim.

Aos meus amigos.

A minha família amada.

Ao meu querido namorado.

EPÍGRAFE

“Exaltado está o Senhor, acima de todas as nações, e a Sua glória, sobre os céus.”

Salmos 113:3

RESUMO

Pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune e endêmica no Brasil, caracterizada pela presença de autoanticorpos que reconhecem glicoproteínas dos queratinócitos, levando à ativação do sistema complemento e resultando na formação de bolhas. A ficolina-3 (*FCN3*) reconhece resíduos acetilados, possivelmente expostos durante o processo acantolítico, e ativa a via das lectinas do complemento. Neste estudo, 105 amostras de pacientes com PF e 169 controles foram genotipados por PCR sequência-específica (PCR-SSP) para três polimorfismos de *FCN3*: +1637delC no exon 5 (rs532781899), o qual causa uma alteração de quadro-de-leitura (p.Leu106SerfsTer65) e gera uma proteína truncada, +3524_+3532del3532TATTTGGCC no intron 5 (rs28362807) e +4479C>A no intron 7 (rs4494157). Os níveis séricos da proteína foram mensurados em 68 controles por ensaio ELISA. Identificaram-se seis haplótipos: *CdelC*, *CinsA*, *CinsC*, *DelinsA*, *DeldelC*, *DelinsC*. A sua distribuição genotípica apresentou-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Após correção para idade e grupo étnico, portadores do haplótipo *CinsA* apresentaram-se associados com a resistência à doença (OR=0,44, p=0,007), assim como heterozigotos *CdelC/CinsA* (OR=0,49, p=0,028), e houve associação entre homozigotos *CdelC/CdelC* e susceptibilidade à mesma (OR=2,06, p=0,013). Observou-se também que indivíduos *CinsA/CinsA* apresentam uma concentração maior de FCN-3 no soro que *CdelC/CdelC* e *DelC/InsA* (médias 38626 vs. 20233 µg/mL e 26211 µg/mL, respectivamente, p=0,015). A concentração foi muito inferior nos indivíduos heterozigotos para a deleção no exon 5 (*C/del*) do que nos livres da deleção (*C/C*), apresentando medianas de 2648 e 18320 ng/mL, respectivamente (p=0,0014). Houve correlação negativa entre FCN-3 e FCN-2 (Spearman R=-0,40, p=0,026) e também entre FCN-3 e MASP-3, um antagonista da via (Spearman R=-0,50, p=0,002). Este é o primeiro trabalho a relatar uma associação com haplótipos de variantes intrônicas de *FCN3* com uma doença. A associação pode ser devido a alterações no processamento do pré-mRNA, causada pelas variações intrônicas que flanqueiam o exon 4, mas provavelmente não a um efeito carona, uma vez que não foram encontrados polimorfismos ligados no grupo afrodescendente. Logo, polimorfismos de *FCN3* parecem regular a concentração da proteína no soro e a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Justificativa.....	8
1.2 Objetivos.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 Pênfigo foliáceo.....	9
2.1.1 Caracterização e formas clínicas.....	9
2.1.2 Distribuição e etiologia.....	12
2.1.3 Tratamento.....	12
2.2 Componente genético do pênfigo foliáceo.....	13
2.3 Sistema Complemento.....	14
2.4 Complemento e pênfigo.....	16
2.5 Ficolinas.....	16
2.5.1 Ficolina-3.....	18
2.5.2 O gene <i>FCN3</i>	18
2.5.3 Polimorfismos no gene <i>FCN3</i>	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Comitê de ética.....	20
3.2 Pacientes e controles.....	20
3.3 Seleção dos polimorfismos.....	21
3.4 Genotipagem.....	22
3.5 Concentração de Ficolina-3.....	25
3.6 Análises Estatísticas.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1 Polimorfismo do exon 5 <i>FCN3</i> +1637delC (SNP rs532781899).....	27
4.1.1 Associação do SNP +1637delC (rs532781899) com a concentração de ficolina-3 em controles.....	28
4.2 Polimorfismo do intron 5 +3524_3532del do <i>FCN3</i> (SNP rs28362807)..	29
4.3 Polimorfismo do intron 7 +4474C>A (SNP rs4494157) do <i>FCN3</i>	31
4.4 Haplótipos <i>FCN3</i>	33

4.5 Associações dos haplótipos com a concentração de ficolina-3 em controles.....	37
4.6 Correlações entre os níveis de ficolina-3 e de outras proteínas da via das lectinas.....	39
5 CONCLUSÃO.....	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

O termo pênfigo vem do grego *pemphix*, que significa bolha. Pênfigo é uma doença multifatorial e autoimune da epiderme, caracterizada por causar lesões bolhosas na pele e nas mucosas, devido parcialmente à presença de autoanticorpos que reconhecem glicoproteínas de adesão celular nos desmossomos, principalmente a desmogleína 1 (CULTON *et al.*, 2008). Este reconhecimento leva à ativação do sistema complemento e resulta na deposição de C3 em espaços intercelulares e na perda de adesão entre os queratinócitos, tal processo é denominado acantólise (AMAGAI *et al.*, 1995). Existem dois tipos de pênfigo, o pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV). O pênfigo foliáceo ocorre no mundo todo, porém o PF endêmico é conhecido popularmente como fogo selvagem no Brasil, devido ao ardor e calor provocado pela doença (CULTON *et al.*, 2008).

O sistema complemento pode ser ativado através de três vias: a via clássica, iniciada por C1q; a via alternativa, iniciada por hidrólises espontâneas do fator do complemento C3 ou do reconhecimento direto de properdina; e a via das lectinas, iniciada pela MBL (lectina ligante de manose), colectina 11 ou ficolinas (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; ALI *et al.*, 2012). As ficolinas são moléculas solúveis do sistema imune inato que reconhecem resíduos acetilados como a N-acetilglucosamina (GARRED *et al.*, 2009). No ser humano existem três tipos diferentes de ficolinas, a ficolina-1 (M-ficolina), ficolina-2 (L-ficolina) e ficolina-3 (H-ficolina ou antígeno Hakata), as quais são codificadas pelos genes: *FCN1*, *FCN2* ambos localizados no cromossomo 9q34 e *FCN3*, localizada no cromossomo 1p36.11, respectivamente (GARRED *et al.*, 2009). Todos os genes *FCN* são polimórficos. Variações no gene *FCN3* podem conduzir a uma deficiência na produção de ficolina-3 e na ativação do sistema complemento e, além disso, podem causar um quadro clínico de imunodeficiência (GARRED *et al.*, 2009). Um dos polimorfismos responsáveis por isto é o rs532781899, o qual representa uma deleção no exon 5, que reduz drasticamente a concentração sérica de ficolina 3 (GARRED *et al.*, 2009).

Em relação ao PF, até o momento, observou-se uma tendência à susceptibilidade à doença em indivíduos com níveis mais elevados de MBL (lectina ligante de manose) e mais baixos da serina protease 2 associada à MBL (MASP-2),

evidenciando o papel da via das lectinas do complemento no desenvolvimento da doença (MESSIAS-REASON et al. 2007).

Neste trabalho, pretende-se investigar uma possível associação entre o polimorfismo do gene *FCN3* e a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo.

1.1 Justificativa

Embora polimorfismos que diminuam a expressão de proteínas do complemento possam aumentar a susceptibilidade a doenças, também podem proteger contra o agravamento de estados inflamatórios, característicos de doenças autoimunes. Com relação ao pênfigo foliáceo, até o momento, observou-se uma tendência à susceptibilidade à doença em indivíduos com níveis mais elevados de MBL (lectina ligante de manose) e mais baixos da serina protease 2 associada à MBL (MASP-2), evidenciando o papel da via das lectinas do complemento no desenvolvimento da doença (MESSIAS-REASON et al. 2007). Entretanto, estudos de polimorfismos do gene *FCN3* e o pênfigo foliáceo não foram publicados até o presente momento, justificando a realização deste estudo.

1.2 Objetivos

O objetivo deste estudo é investigar a existência de associação entre polimorfismos do gene *FCN3* e concentrações séricas da ficolina-3 com a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. Sendo assim, pretende-se:

- 1) Descrever as frequências alélicas, genóticas e haplotípicas dos polimorfismos rs532781899, rs28362807, rs4494157 em pacientes com pênfigo foliáceo e controles;
- 2) Comparar estas frequências com as descritas pelo projeto 1000Genomes e HapMap;
- 3) Avaliar possíveis associações entre os genótipos e a concentração de ficolina-3 nos controles;
- 4) Avaliar possíveis associações entre os genótipos, haplótipos e alelos e a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pênfigo foliáceo

2.1.1 Caracterização e formas clínicas

O termo pênfigo se refere a um grupo de doenças bolhosas autoimunes e multifatoriais envolvendo a pele e mucosas. Há dois tipos principais de pênfigo: pênfigo vulgar (PV), no qual a acantólise ocorre no estrato espinhoso suprabasal; e pênfigo foliáceo (PF), com acantólise na camada granulosa subcórnea (CULTON *et al.*, 2008). Estas doenças caracterizam-se pela formação de autoanticorpos contra proteínas do desmossomo (JONES *et al.*, 1984), estrutura importante para a adesão celular, e pelo desprendimento das células da epiderme, processo chamado de acantólise. A perda de aderência intercelular pode ser vista com baixa ampliação em uma imagem de microscópio eletrônico de varredura (Figuras 1A) (ALMEIDA, *et al.*, 2013). Os queratinócitos acantolíticos apresentam-se em uma forma irregular (Figura 1B). Com uma elevada ampliação, pode-se observar a ruptura das ligações intercelulares epidérmicas (ALMEIDA, *et al.*, 2013) (Figuras 2A e 2B).

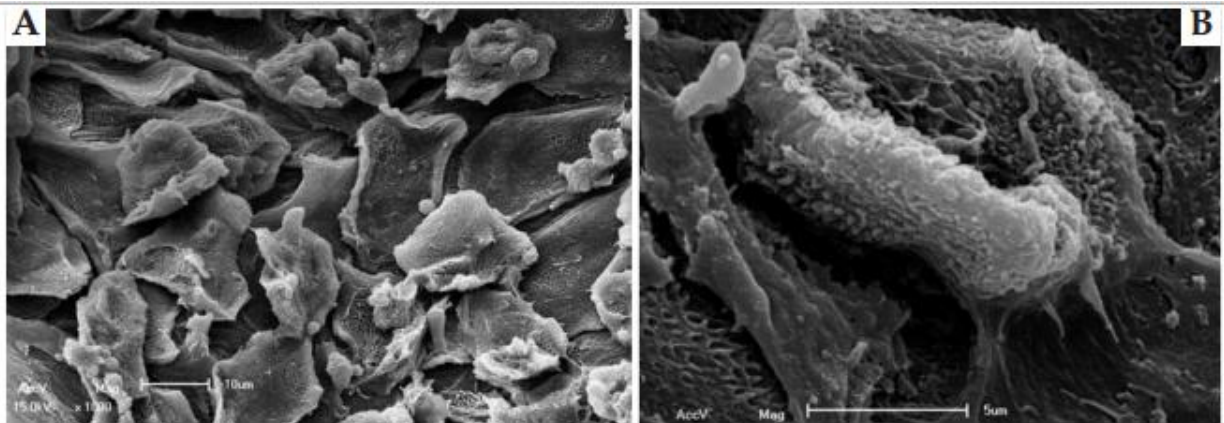


Figura 1: A. Queratinócitos soltos sob baixa ampliação (x1.000). B. Detalhe de um queratinócito acantolítico (x 4.500).

FONTE: ALMEIDA, *et al.*, 2013.

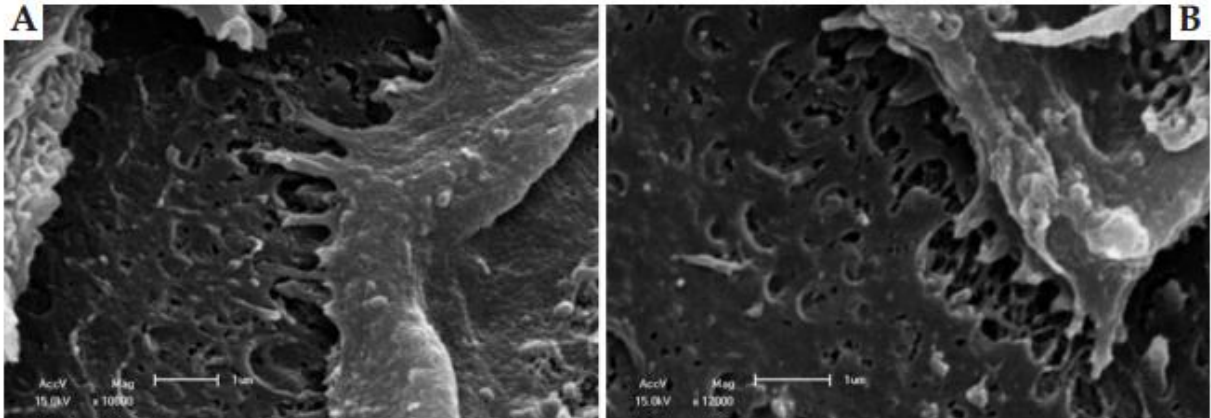


Figura 2: A - Grandes ampliações da ruptura de ligações intracelulares da epiderme (x10.000 e 12.000) B - Separação intercelular.

FONTE: ALMEIDA, et al., 2013.

Sendo assim, as proteínas-alvo dos autoanticorpos de PF e PV nos desmossomos são as desmogleínas (AMAGAI et al., 1995). No PF, um dos principais alvos é a desmogleína (dsg) 1, que é encontrada principalmente na camada superficial da epiderme. Possivelmente, esta é uma das razões por que as lesões epiteliais do PF são superficiais (Figuras 3 e 4).



Figura 3: Lesões de pêfigo foliáceo.

FONTE: Cedida gentilmente pelo grupo do Laboratório de Genética Molecular Humana da Universidade Federal do Paraná.



Figura 4: Lesões avançadas de pênfigo foliáceo.

FONTE: Pavoni, *et al.*, 2003

A doença pênfigo foliáceo apresenta duas formas clínicas, a esporádica, também chamada de pênfigo de Cazenave, que exibe distribuição mundial, e a endêmica em determinadas áreas geográficas, denominada pênfigo foliáceo endêmico (PFE), ou fogo selvagem (apenas no Brasil) (CULTON *et al.*, 2008). Esta é a única doença simultaneamente autoimune e endêmica (CAMPBELL *et al.*, 2001). O PFE é clinicamente e histopatologicamente idêntico ao PF esporádico (STANLEY *et al.*, 1986).

O PF pode ser classificado em duas formas: a localizada e a generalizada. Na forma localizada, as lesões são vesículas e pequenas bolhas, que se rompem facilmente, deixando pequenas áreas erosivas. São comumente limitadas à face, cabeça, pescoço e partes altas do tronco. A forma generalizada é caracterizada pela disseminação das lesões no tronco e nos membros, além da face e do couro cabeludo (CAMPBELL *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2005 *apud* OLIVEIRA, 2015).

O quadro clínico pode ser classificado como agudo, crônico, recorrente e curado. Casos agudos são aqueles com duração de menos de 6 semanas; casos crônicos são os que duram mais de 6 semanas, e casos recorrentes são os que entram em remissão após o tratamento, mas recomeçam depois de um tempo. Casos curados não apresentam lesões ou sorologia positiva, por no mínimo 12 meses (RIBEIRO *et al.*, 2005 *apud* OLIVEIRA, 2015).

2.1.2 Distribuição e etiologia

O pênfigo foliáceo ocorre de forma esporádica no mundo, porém, no Brasil ele ocorre de forma endêmica, principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, sendo também conhecido como fogo selvagem. A doença afeta crianças e jovens adultos frequentemente, sendo que o pico de incidência é na segunda e na terceira décadas de vida e a proporção sexual é de 1:1 (AOKI et al., 2004 e DIAZ et al., 1989). A incidência mundial dos pênfigos é de 0,75-5 casos/1.000.000 ao ano, variando entre os países (GONÇALVES, 2011).

Nenhum grupo racial ou étnico é isento do desenvolvimento da doença; a incidência do fogo selvagem está relacionada principalmente com a ocupação em áreas rurais. Isso não quer dizer que pessoas que vivem na cidade nunca poderiam desenvolver essa doença, porém isso é extremamente raro. Historicamente, pacientes com pênfigo trabalharam ou viveram em áreas endêmicas por meses ou anos. A doença atinge principalmente pessoas de baixa renda, que vivem em moradias pobres, com infestações de roedores, com diversos insetos que picam, pulgas, e ocasionalmente, outros insetos. Os moradores têm o hábito de domesticar animais e um saneamento precário. Além disso, a maioria dos portadores da doença vive e trabalha em áreas rurais, próximo a rios e córregos (DIAZ et al., 1989).

A endemicidade está presente em áreas rurais da América do Sul, tendo sua maior incidência no Brasil, e mesmo assim é uma doença muito negligenciada pela saúde pública. Isto aponta para existência de fatores ambientais nas regiões endêmicas, o pico de incidência de novos casos de fogo selvagem ocorre no fim da estação chuvosa, quando os insetos são mais abundantes. A maioria das pessoas relata exposição massiva à picada de insetos, incluindo a de uma mosca preta chamada borrachudo (*Simulium pruinosum*). A distribuição desse inseto se sobrepõe e coincide com a distribuição das áreas endêmicas. Na costa do Brasil, onde essa espécie não é encontrada, uma espécie diferente pertencente ao mesmo gênero é encontrada, *S. pertinax* podendo exercer o mesmo papel do borrachudo (DIAZ et al., 1989; LOMBARDI et al., 1992).

2.1.3 Tratamento

A administração de glucocorticosteróide é essencial para estabelecer o controle da doença durante o estágio agudo. No entanto, esse tratamento pode

causar graves efeitos colaterais, incluindo a morte. Portanto, pacientes com pêfigo precisam de remédios que possam substituir as drogas atuais. O desenvolvimento de um tratamento que não envolva esteróides tem sido dificultado pela falta do pleno entendimento dos mecanismos que causam a ruptura entre os queratinócitos e a morte em pacientes com pêfigo. Portanto, avanços no conhecimento da patogenia do pêfigo podem revelar novos alvos de tratamento e perspectivas terapêuticas (GRANDO, 2011).

2.2 Componente genético do pêfigo foliáceo

Os fenótipos complexos das doenças multifatoriais são resultantes dos efeitos de muitos genes situados em diferentes *loci*, frequentemente combinados com os fatores ambientais, e podem ser classificados em duas categorias. Como caractere qualitativo, quando o fenótipo ocorre em apenas duas formas, dependendo de um efeito de limiar para a sua expressão (caso de muitas malformações congênitas). E como caractere quantitativo, apresentando múltiplos fenótipos gradativos (como a pressão sanguínea). O ambiente também promove alterações como a ativação ou desativação da expressão dos genes, por mecanismos epigenéticos. Essas mudanças podem atenuar sintomas de doenças ou provocar seu desenvolvimento (SNUSTAD e SIMMONS, 2008).

Existe um componente genético de susceptibilidade ao PF, pois é observada agregação familiar e, desde 1989, sabe-se que alguns genes estão associados à susceptibilidade diferencial ao pêfigo foliáceo endêmico (DIAZ et al., 1989; PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989). Além da associação com genes HLA de classe II, que foi a primeira descrita (MORAES et al., 1997; PAVONI et al., 2003; PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989), outros genes também já foram estudados quanto à susceptibilidade ao pêfigo foliáceo. Já foram observadas associações com genes para citocinas, IL4 e IL6 (PEREIRA et al., 2004), moléculas coestimuladoras de linfócitos T, CD86 e CTLA4 (DALLA-COSTA et al., 2010) e moléculas coestimuladoras de células B, CD40, CD40L e BLYS (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009). Genes para outras moléculas do sistema imune, assim como o gene para a *dsg1*, já foram estudados, mas nenhuma associação foi observada (KÖHLER e PETZL-ERLER, 2006; PAVONI et al., 2006; PETZL-ERLER e MALHEIROS, 2005; PINCERATI et al., 2010; ROXO et al., 2003).

2.4 Sistema complemento

O sistema complemento compõe um dos principais mecanismos da resposta imune inata contra agentes infecciosos e, além disso, é um importante efetor da imunidade mediada por anticorpos. Dele, fazem parte mais de 35 proteínas plasmáticas e de superfície celular capazes de reconhecer patógenos; diferenciar tecidos saudáveis, restos celulares e células apoptóticas; e atuar na manutenção da homeostase (BOLDT; GOELDNER; MESSIAS-REASON, 2012). Este reconhecimento é realizado por proteínas potencialmente inativas, que se tornam ativadas de forma estável após sua ligação aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a constituintes celulares alterados, desencadeando uma cascata proteolítica que culmina com a destruição por lise osmótica do patógeno e ou da célula alterada, causando também a sua opsonização e remoção por fagocitose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O sistema complemento pode ser ativado através de três vias: a via clássica, iniciada pela ligação de C1q na superfície do patógeno, na proteína C reativa ou em complexos antígeno-anticorpo (Figura 5) (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010a). A via alternativa é iniciada por hidrólises espontâneas do fator do complemento C3 ou do padrão de reconhecimento direto de properdina. Já a via das lectinas é iniciada pela atividade proteolítica desencadeada pelas serinas proteases (MASPs) associadas à lectina ligante de manose (MBL), colectinas (COLEC11) ou às ficolinas (Ficolina-1, Ficolina-2 e Ficolina-3), as quais reconhecem padrões de açúcares/resíduos acetilados, presentes nos patógenos. A MBL era considerada a única iniciadora da via. Porém, representantes da família das ficolinas também a iniciam, sendo que a ficolina utiliza as mesmas serinas proteases de MBL, para ativar o sistema complemento. Além destas, a colectina 11 é capaz de ativar a via das lectinas. (FUJITA, 2002; GARRED et al., 2009; ALI et al., 2012).

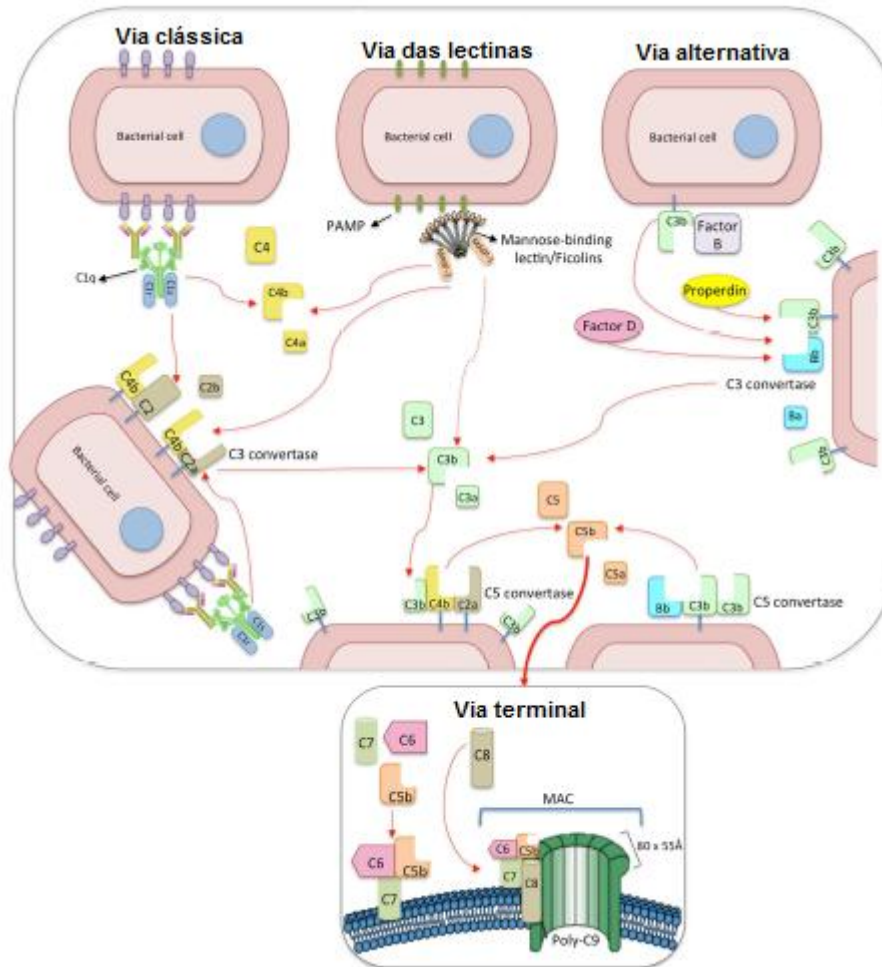


Figura 5: Esquema das três vias de ativação do Sistema Complemento.

NOTA: As serina proteases associadas às moléculas iniciadoras da via clássica e das lectinas clivam C4 e C2 em C4b2b, formando a enzima C3 convertase, que cliva C3 em C3a (uma anafilatoxina) e C3b. C3b é depositado na superfície de patógenos e células alteradas, opsonizando-as. Também forma a C5 convertase, que cliva C5 em C5a (uma anafilatoxina) e C5b, cuja associação com C6, C7 e C8 serve de sítio para polimerização de C9 e formação do complexo de ataque à membrana (via terminal do complemento). Este, uma vez associado a membranas celulares, promove a sua destruição.

LEGENDA: PAMP: padrões moleculares associados a patógenos; MBL: lectina ligante de manose; MASP: serina protease associada a MBL; MAC: complexo de ataque a membrana.

FONTE: Beltrame *et al.*, 2015.

A cascata proteolítica desencadeada pelo processo de ativação permite uma grande amplificação e rapidez da resposta inflamatória, pois cada ativação de um elemento pré-formado pode gerar, rapidamente, múltiplas enzimas e complexos enzimáticos ativados. Os produtos da clivagem sequencial C3, C4 e C5 são capazes de promover múltiplos efeitos biológicos. As anafilatoxinas C3a e C5a são potentes mediadores inflamatórios, causando contração da musculatura lisa e degranulação de basófilos e mastócitos, com liberação de histamina e outras substâncias vasoativas. Além disso, C5a é um potente fator quimiotático para células fagocíticas,

levando à ativação e liberação de enzimas lisossossomais e radicais de oxigênio. Já C3b e C4b previnem a agregação de complexos imunes e promovem a sua eliminação por meio de receptores em células fagocíticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

2.5 Complemento e Pênfigo

Nas lesões epidérmicas de pacientes de pênfigo foliáceo, ocorre deposição dos componentes C1q, C3 e C4 do sistema complemento (BYSTRYN *et al.*, 1978, KAWANA *et al.* 1988, *apud* OLIVEIRA). C1q é a molécula iniciadora da via clássica, reconhecendo os complexos formados por autoanticorpos. Todas as três vias também podem causar a deposição de C3 e C4, e do complexo lítico terminal C5b-9 (TLC). A deposição deste complexo tem sido frequentemente observada no pênfigo foliáceo, assim como no pênfigo vulgar (XIA *et al.* 1988; KAWANA *et al.* 1989, 1990; LAPIERE *et al.* 1998; MESSIAS-REASON *et al.* 2011 *apud* OLIVEIRA). No caso da via alternativa, isto foi verificado pela detecção do fragmento de clivagem do fator B, causada pela hidrólise espontânea de C3 (MESSIAS *et al.* 1989). Com relação à via das lectinas, observou-se uma tendência à susceptibilidade à doença em indivíduos com níveis mais elevados de MBL (lectina ligante de manose) e mais baixos da serina protease 2 associada à MBL (MASP-2) (MESSIAS-REASON *et al.* 2007).

2.6 Ficolinas

As ficolinas fazem parte do sistema imune inato e têm função de reconhecimento de moléculas no sistema complemento. Existem três tipos diferentes de ficolinas, a ficolina-1 (M-ficolina), ficolina-2 (L-ficolina) e ficolina-3 (H-ficolina ou antígeno Hakata), as quais são codificadas pelos genes: *FCN1*, *FCN2* e *FCN3*, respectivamente. Filogeneticamente, a ficolina-3 é considerada a mais antiga. Todos os genes *FCN* são polimórficos. Variações no gene *FCN3* podem conduzir a uma deficiência na produção de ficolina-3 e na ativação do sistema complemento, causando um quadro clínico de imunodeficiência (GARRED *et al.*, 2009).

Ficolinas são proteínas multiméricas, constituídas por subunidades de 34-35 kDa. A Ficolina-3 (H-ficolina) é 48% homóloga a Ficolina-1 e 2 (M-ficolina e L-

ficolina), enquanto estas últimas são 80% homólogas entre si (Figura 6). As ficolinas 1, 2 e 3 apresentam 326, 313 e 299 aminoácidos, respectivamente (GARRED et al., 2009).

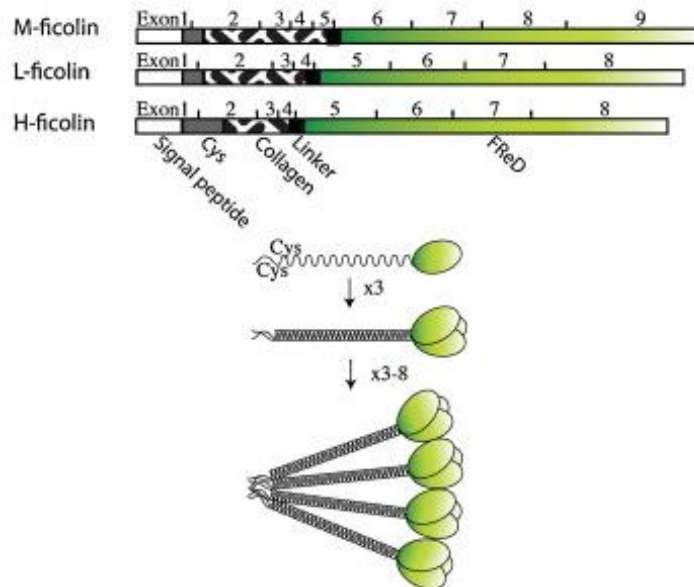


Figura 6: Estrutura geral da ficolina 3 (H-ficolina) e comparação entre as proteínas codificadas pelos genes *FCN1*, *FCN2*, *FCN3*.

NOTA: o peptídeo sinal é codificado pelo exon 1, a porção rica em cisteína e a cauda de colágeno pelos exons 2 e 3, a região de pescoço ("linker") pelo exon 4 e o domínio de FBG (similar a fibrinogênio) pelos exons 5, 6, 7 e 8.

FONTE: THOMSEN *et al.*, 2011.

As ficolinas compartilham alguns elementos estruturais, como um domínio N-terminal que contém resíduos de cisteína seguida por um domínio semelhante a colágeno e um domínio C-terminal, denominado FBG (similar a fibrinogênio), que reconhece principalmente, resíduos acetilados (SUGIMOTO et al. 1998). A estrutura geral da ficolina é muito semelhante a da MBL, a qual também apresenta uma sequência semelhante a colágeno, e cujos oligômeros são formados pela reunião de estruturas triméricas, composta por três cadeias polipeptídicas idênticas. As ficolinas são compostas por quatro ou mais trímeros unidos por ligações de dissulfeto na região aminoterminal. No oligômero, o domínio semelhante a colágeno forma um complexo com MASP proteases, que iniciam a cascata do complemento, depois que o domínio de fibrinogênio interage com estruturas-alvo acetiladas (GARRED et al., 2009).

2.6.1 Ficolina-3

A ficolina-3 foi inicialmente identificada como antígeno Hakata, o qual é reconhecido por um autoanticorpo no soro dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. A presença desses autoanticopos pode estar associada a essa doença, devido aos níveis baixos de ficolina-3 e à baixa atividade do sistema complemento (GARRED et al., 2009).

A ficolina-3 é a mais abundante no soro e o mais potente ativador da via das lectinas *in vitro* (MICHALSKI et al., 2015), é expressa principalmente no fígado e nos pulmões e em menor quantidade no coração, rim, baço, pâncreas, placenta e no tecido cerebral (HUMMELSHOJ et al. 2008), e é considerada um importante fator do sistema imune inato. Comparado com MBL e as outras ficolinas, a ficolina 3 (ficolina H) tem maior capacidade de ativação do complemento e é altamente resistente à colagenase bacteriana (HUMMELSHOJ et al., 2008). Também participa no processo de eliminação de células apoptóticas tardias e desempenha um papel protetor contra o desenvolvimento de autoimunidade (HONORE et al., 2007; KURAYA et al., 2005). A concentração média da ficolina-3 no soro é de cerca de 18,4 µg/ml (KRARUP et al., 2005). A deficiência de ficolina-3 está associada com hipocomplementemia, lúpus eritematoso sistêmico (revisto por GARRED et al., 2009); e baixos níveis desta proteína foram associados à enterocolite necrosante em neonatos prematuros (SCHLAPBACH et al., 2010) e insuficiência cardíaca avançada (PROHÁSZKA et al., 2013). Por outro lado, foi demonstrado que altas concentrações de ficolina-3 são um fator de risco independente para a perda do enxerto, ao realizar transplantes renais (SMEDBRÅTEN et al., 2015).

2.6.2 O gene *FCN3*

O gene *FCN3* apresenta 8 exons e está localizado no cromossomo 1p36.11. O gene é altamente conservado e apresenta cinco substituições não sinônimas, com frequências abaixo de 5%: p.Leu12Val, p.Leu117fs (que produz uma proteína truncada, sem capacidade de ativação do complemento, e está associada com infecções repetitivas - (HUMMELSHOJ et al., 2008; MUNTHER-FOG et al., 2009), p.Thr125Ala, p.Glu166Asp e p.Val287Ala (HUMMELSHOJ et al., 2008) (Figura 7).

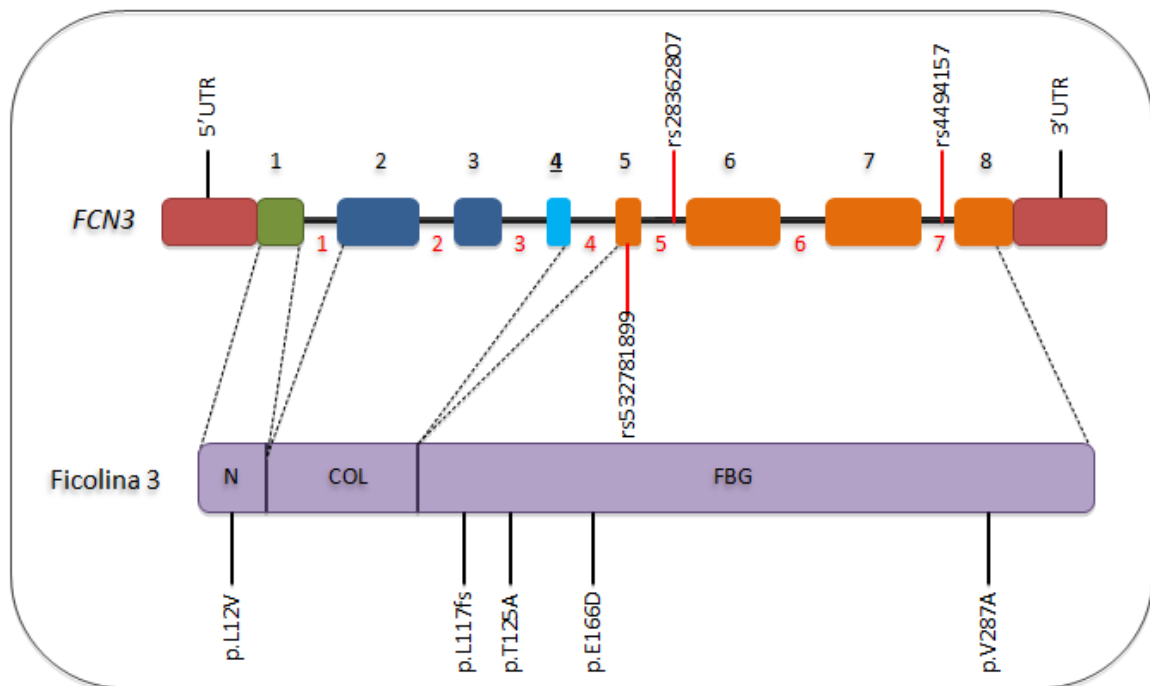


Figura 7. Estrutura gênica e polimorfismos do gene *FCN3*, relacionados aos domínios da proteína.

NOTA: o SNP rs532781899 (+1637del) representa uma deleção que causa uma mudança no quadro de leitura; o SNP rs28362807 caracteriza a deleção ou a inserção de pares de bases (+3532del ou +3532TATTTGGCC) e o SNP rs4494157 representa uma citosina ou uma adenina (+4479 C ou +4479 A).

LEGENDA: Os exons estão representados por retângulos numerados em preto, exons que codificam o mesmo domínio aparecem com cores similares (verde: exon que codifica região aminoterminal rica em cisteína, azul: exon que codifica domínio semelhante a colágeno, laranja: exon que codifica o domínio de fibrinogênio; exon 1 e 8 estão acrescidos da região não traduzida, em marrom); o exon 4, o qual está sublinhado e destacado na cor azul clara é alternativo; os introns estão indicados com a numeração vermelha e os SNPs investigados estão apontados em vermelho. Os tamanhos dos exons e introns não são proporcionais. NCOL: colágeno. FBG: domínio de fibrinogênio, UTR: não traduzido. (adaptado de figura gentilmente cedida por Goeldner. I., 2015)

2.6.3 Polimorfismos do gene *FCN3*

Entre os polimorfismos descritos para o gene *FCN3*, está a deleção *FCN3+1637delC* (rs532781899) que ocorre no exon 5 e conduz a um deslocamento do quadro de leitura, resultando numa antecipação do término da transcrição (HUMMELSHOJ et al., 2008). Essa mudança do quadro de leitura provoca uma alteração na composição de aminoácidos da extremidade C-terminal da proteína, que vai desde a posição do aminoácido 117 até o 180. Também gera um códon de parada precoce, dando origem, a princípio, a uma proteína truncada (*FCN3+1637delC_Leu117fs*), faltando 182 aminoácidos da sequência do domínio de

fibrinogênio (HUMMELSHOJ et al., 2008). Um trabalho conduzido em pacientes imunodeficientes observou que heterozigotos *FCN3+1637delC* apresentavam cerca de 50% dos níveis de ficolina-3 encontrados em pacientes sem a deleção (MUNTHE-FOG et al., 2008). Esta mutação também foi investigada em mulheres com câncer de ovário, no entanto não houve diferença significativa entre pacientes e controles referentes a *FCN3+167delC* (SZALA et al., 2013). O polimorfismo rs4494157 (+4479C>A) do intron 7 já foi investigado em 900 crianças dinamarquesas de até 4 anos com infecções respiratórias, porém não se observou uma associação (RUSKAMP et al., 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

Este estudo foi aprovado pela CONEP (Comitê Nacional de Ética em Pesquisa), parecer 505.988, de 02/01/2014, sob o título “Genes e suas variações: análise molecular, evolutiva e funcional, em populações e em doenças”. Todos os pacientes foram informados dos objetivos da pesquisa e preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 Pacientes e controles

As amostras consistem em indivíduos com pênfigo foliáceo e indivíduos sem a doença, doadores de sangue, considerados como controle. As amostras de DNA utilizadas já haviam sido coletadas e o DNA já havia sido extraído através do método de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (MANIATIS *et al.*, 1982, com adaptações) dos pacientes e, no caso dos controles, por meio do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin – Estados Unidos).

Ao total, foram avaliados 174 pacientes e 238 controles, sendo que as amostras de sangue dos pacientes foram coletadas, principalmente, no Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS) e as dos controles, no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná – HEMEPAR, em Curitiba (PR). As amostras

foram descritas quanto à idade, sexo, origem étnica, principal ocupação, local de coleta, município de nascimento e município de residência dos indivíduos.

Dentre os controles e os pacientes, as amostras foram subdivididas em dois grupos: (1) Euro-descendentes (com base em frequências alélicas de HLA, estes apresentam um componente africano subsaariano médio de 9% e ameríndio de 5%) e (2) Afro-descendentes (com base nas frequências alélicas de HLA, estes tem, pelo menos, 40% de componente africano e 6% ameríndio) (BRAUN-PRADO, *et al.*, 2000; PROBST, *et al.*, 2000 apud BOLDT, *et al.*, 2013). As amostras foram pareadas quanto a sexo. As associações genéticas foram corrigidas para a idade, por meio de regressão logística.

3.3 Seleção dos polimorfismos

Dentre os polimorfismos comuns do gene *FCN3* que potencialmente alteram o processamento do pré-mRNA, os seguintes foram selecionados: rs28362807 (+3524_+3532delTATTTGGCC) do intron 5 e rs4494157 (+4479C>A) do intron 7, situados logo após o exon 4, que é alternativo. É possível que determinado alelo destes polimorfismos favoreça a inclusão ou exclusão do exon 4, levando o gene a expressar preferencialmente apenas uma de pelo menos duas isoformas, uma com e outra sem o exon 4 (FCN3-001 e FCN3-002, respectivamente). Por outro lado, o polimorfismo rs532781899 (+1637delC) do exon 5, foi selecionado por causar deficiência na expressão de ficolina-3. As frequências dos polimorfismos em diferentes populações podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1. Frequência alélica dos polimorfismos em diferentes populações.

SNP	Região	Alelos	Europeus	Asiáticos	Africanos	Africanos
			N=46	N=86	subsaarianos N=226	americanos N=46
rs532781899	Exon 5	+1637C	98%	n.e.	n.e.	98%
rs532781899	Exon 5	+1637del	2%	n.e.	n.e.	2%
rs28362807	Intron 5	+3524_+3532del	59%	n.e.	n.e.	67%
rs28362807	Intron 5	+3524_+3532TATTTGGCC	41%	n.e.	n.e.	33%
rs4494157	Intron 7	+4479 C	70%	88%	90%	91%
rs4494157	Intron 7	+4479 A	30%	12%	10%	9%

LEGENDA: N número de cromossomos; SNP polimorfismos de nucleotídeo único; n.e.: não existem dados disponíveis.

FONTE: NCBI (disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=532781899. Acessado dia 11/11/2015).

3.4 Genotipagem

As amostras de pacientes e controles foram genotipadas para os SNPs rs532781899 (+1637delC) do exon 5, rs28362807 (+3524_+3532delTATTTGGCC) do intron 5 e rs4494157 (+4479C>A) do intron 7, do gene *FCN3*, através da amplificação alélica por PCR sequência-específica (PCR-SSP). As sequências e outros dados dos iniciadores utilizados podem ser observados na tabela 2.

As PCRs foram realizadas a partir de 20 ng/μL de DNA genômico e 0,2 μM de cada iniciador específico na presença de 0,5 μM de MgCl₂, 0,2 μM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM e 0,03 unidades de Taq polimerase. Todas as amplificações foram iniciadas pela desnaturação por 3 minutos a 95° C e terminam pela extensão por 10 minutos a 72° C. A PCR é realizada em 35 ciclos, cada ciclo iniciando com 95°C por 30 segundos e terminando com 72°C por 1 minuto. A temperatura de acoplamento dos iniciadores é alta nos 10 primeiros ciclos (60° C), intermediária nos 10 seguintes (58° C) e baixa nos 15 últimos ciclos (56° C), garantindo especificidade e quantidade de produto. Cada PCR foi acompanhada de controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA, e controles de DNA sabidamente positivos ou negativos para os genótipos procurados. O resultado é observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5 % corado com SYBR® Safe (Invitrogen), fluorescentes sob luz azul (figuras 8 e 9). Em todos os casos, a genotipagem é rápida e baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados.

Tabela 2. Iniciadores específicos utilizados nas PCR-SSP para *FCN3*.

SNP	Região	Alelos	Iniciador direto	Iniciador reverso	Tamanho do fragmento
rs532781899	Exon 5	+1637C +1637del	5'TAGGGTGGGATCTCTGCTTG 3'	5'TGTCACAAAAGACTGGGAGGG3' 5'TGTCACAAAAGACTGGGAGGC3'	748pb ¹
rs28362807	Intron 5	+3524_+3532del +3524_+3532TATTTGGCC	5'GCCACCAAGCGTTCTTGG3' 5'CCACCAAGCGTGGCCAAA3'		984pb ²
rs4494157	Intron 7	+4479 C +4479 A		5'GAGGAGGAAACTGAGGCTCAG3' 5'GAGGAGGAAACTGAGGCTCAT3'	

LEGENDA: pb pares de base; ¹ controle endógeno da PCR-SSP: 500pb do exon 8 do gene *FCN2* amplificado com o primer direto 5'GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3' e reverso 5' AAAGGGTTGATTGCGGAAAC 3', ² controle endógeno da PCR multiplex: 431pb do gene *HGH* amplificado com o iniciador direto 5'TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA3' e reverso 5'CCACTCACGGATTCTGTTGTGTTTC3' .

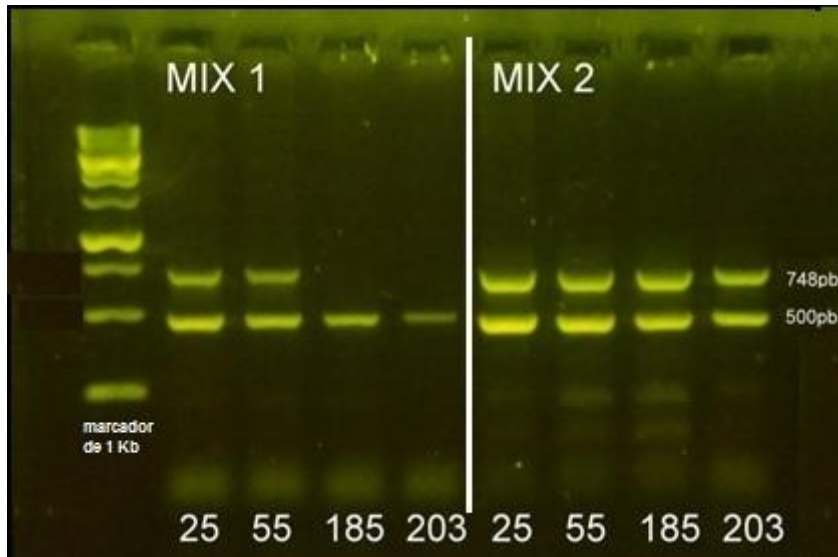


Figura 8: Amplificação sequência-específica da mutação *FCN3+1637delC* (rs532781899).

NOTA: O marcador de peso molecular utilizado foi de 1Kb. O primeiro mix contém iniciadores específicos que amplificam o fragmento contendo a deleção no exon 5 do gene *FCN3* (748pb), e o segundo mix contém iniciadores específicos que amplificam o mesmo fragmento (749pb), quando não há a deleção. As bandas de 500pb são produtos da amplificação do controle endógeno da reação, o exon 8 do gene *FCN2*. A interpretação dos resultados encontra-se na tabela abaixo:

Amostra	MIX 1	MIX 2	Genótipo
25	+	+	<i>C/Del</i>
55	+	+	<i>C/Del</i>
185	-	+	<i>C/C</i>
203	-	+	<i>C/C</i>

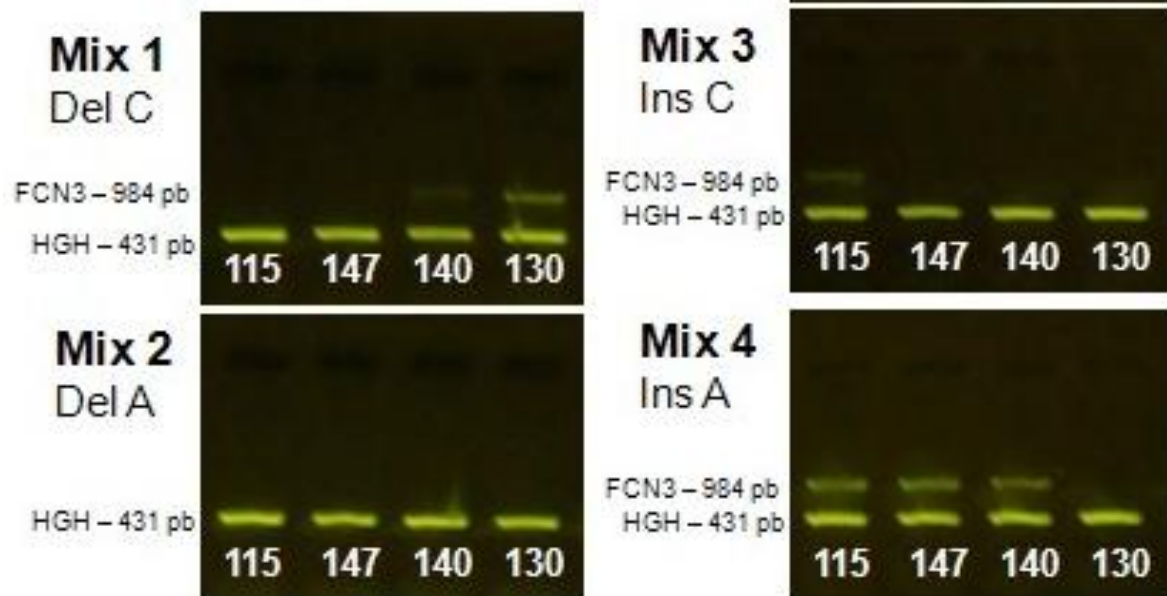


Figura 9: Amplificação sequência-específica dos polimorfismos: rs28362807 (+3524_+3532del/TATTTGGCC) do intron 5 e rs4494157 (+4479C>A) do intron 7, do gene *FCN3*.

NOTA: As bandas específicas desta PCR são de 984pb. As bandas de 431pb são produtos da amplificação do controle endógeno da reação, do gene *HGH*. O primeiro MIX amplifica o fragmento contendo a deleção no intron 5 e a citosina no intron 7; o MIX 2 amplifica o fragmento contendo a deleção no intron 5 e a adenina no intron 7 (esta amplificação nunca ocorreu e este haplótipo também não é reportado na literatura, até o momento); o MIX 3 amplifica o fragmento contendo a inserção no intron 5 e a citosina no intron 7; por fim, o MIX 4 amplifica o fragmento com a inserção no intron 5 e a adenina no intron 7. A interpretação dos resultados encontra-se na tabela abaixo:

Amostra	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	Genótipo
115	-	-	+	+	<i>InsC/InsA</i>
147	-	-	-	+	<i>InsA/InsA</i>
140	+	-	-	+	<i>DelC/InsA</i>
130	+	-	-	-	<i>DelC/DelC</i>

3.5 Concentração de Ficolina-3

A concentração de ficolina-3 no soro foi mensurada em estudo anterior realizado no laboratório de Imunopatologia Molecular no Hospital de Clínicas, através de ensaio de imoadsorbância enzimática HK320 (Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands). Foram avaliadas 76 amostras controles.

3.6 Análises estatísticas

As frequências alélicas e genóticas foram determinadas através de contagem direta. A avaliação da hipótese de equilíbrio de Hardy Weinberg e de homogeneidade entre populações foi feita utilizando-se a estratégia de Guo e Thompson (1992) e o teste exato de diferenciação populacional de Raymond e Rousset, respectivamente, implementados no pacote de programas ARLEQUIN v.3.1 (EXCOFFIER e LISCHER, 2015) Para as análises de associação, foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se o teste de Fisher bicaudal. Também foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. A estatística descritiva em relação às concentrações de proteínas circulantes foi apresentada em mediana e percentis, e os dados foram avaliados pelo método de correlação de Spearman. As comparações entre medianas foram feitas através dos testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Os dados também foram avaliados por análise de regressão logística através do programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA). Valores de “p” menores que 0,05 foram considerados significativos. Para auxiliar a análise estatística deste trabalho foi utilizado o programa “GraphPad Prism – versão 3.0” e Excel. Para verificar desequilíbrio de ligação com outros SNPs vizinhos aos investigados, foi utilizado o site SNAP (JOHNSON, *et al.*, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As distribuições das frequências genóticas de todos os haplótipos apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Por meio do teste exato de diferenciação populacional, observou-se que estas distribuições diferem entre: controles e pacientes euro-descendentes ($p= 0,001$); controles euro-descendentes e pacientes afrodescendentes ($p= 0,002$) e controles afrodescendentes e pacientes euro-descendentes ($p= 0,04$). Também houve uma tendência de diferenciação entre controles afrodescendentes e pacientes afrodescendentes ($p= 0.10$). Por esta razão, as amostras de controles e pacientes foram separadas em: 140 indivíduos controles euro-descendentes, 70 pacientes euro-descendentes, 29 indivíduos controles afrodescendentes e 35 pacientes afrodescendentes (Figura 10).

4.1 Polimorfismo do exon 5 *FCN3+1637delC* (SNP rs532781899)

Foi realizada a genotipagem de *FCN3+1637delC* em 174 pacientes e 238 controles. Foram encontrados 19 indivíduos heterozigotos para a deleção e nenhum homozigoto. Dentre os 19 indivíduos, 8 são pacientes e 11 são controles. Portanto, a frequência alélica encontrada foi de 2,29% nos pacientes e de 2,31% nos controles para a presença da deleção (valor de $p=1,0$) (Tabela 3). Esta frequência é similar à reportada para populações europeias e afrodescendentes pelo projeto 1000Genomes (2,2% e 2,1%, respectivamente). Ao analisar o banco de dados do projeto 1000Genomes, observou-se que este polimorfismo não foi identificado em populações orientais, como a chinesa e a japonesa. A maior frequência da deleção é observada na população ibérica: 4,2%, e no grupo étnico Mandinka da Gâmbia: 4,4% (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:27372680373680;v=rs532781899;vdb=variation;vf=658960 18). O fato de a deleção ocorrer em indivíduos heterozigotos aparentemente saudáveis leva a sugerir que a imunodeficiência causada pelo alelo é herdada de modo recessivo. Além disso, há indicadores na literatura de que a penetrância do alelo causador desta imunodeficiência é incompleta (MICHALSKI *et al.*, 2015). Assim como não houve associação com pênfigo no presente trabalho, também não houve associação com câncer de ovário, como descrito por Szala *et al.* (2013).

Tabela 3. Frequência alélica do SNP em pacientes de pênfigo foliáceo, controles e em diferentes populações.

SNP	Região	Alelos	Pacientes (N=348)	Controles (N=476)	Europeus (N=46)	Afro-americanos (N=48)
rs532781899	Exon 5	+1637C	97,71%	97,69%	97,8%	97,9%
	Exon 5	+1637del	2,29%	2,31%	2,2%	2,1%

NOTA: para as populações europeia e afro-americana, os dados correspondem aos PGA-EUROPEAN-PANEL e PGA-AFRICAN-PANEL do NCBI, respectivamente.

LEGENDA: SNP= polimorfismo de nucleotídeo único; N= número de cromossomos.

Conforme o gráfico abaixo (Figura 10) nota-se que, embora a deleção apresente uma baixa frequência, é superior em afrodescendentes, variando de 0,71% em controles euro-descendentes até 5,71% em pacientes afrodescendentes.

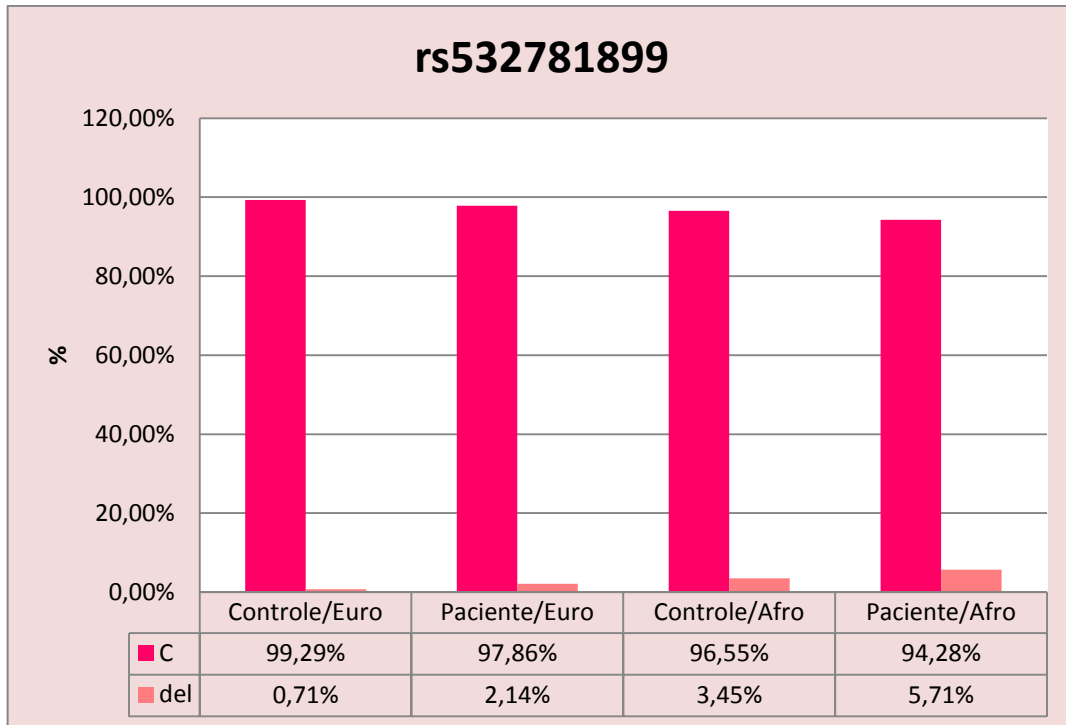


Figura 10: Frequência da deleção no exon 5 do gene *FCN3* em controles e pacientes de pênfigo foliáceo, ambos subdivididos em descendentes europeus e africanos.

NOTA: O valor de p para a diferença entre euro-descendentes foi igual a $p=0,33$ e entre afrodescendentes, $p=0,68$ (teste exato de Fisher). Para o agrupamento étnico o número amostral foi reduzido. Número de cromossomos: Controle/Euro: 280; Paciente/Euro: 140; Controle/Afro: 58; Paciente/Afro:70.

LEGENDA: Euro: eurodescendentes, Afro: afrodescendentes; Del: deleção.

4.1.1 Associação do SNP rs532781899 com a concentração de ficolina-3 em controles

Ao comparar as concentrações de ficolina-3 em 68 controles com e sem a deleção, foi observada uma concentração mais baixa desta nos indivíduos heterozigotos (*C/del*), apresentando mediana de 2648 ng/mL (215,9-2636 ng/mL), enquanto os livres da deleção (*C/C*), apresentaram mediana de 18320 ng/mL (4157-60320 ng/ml) (Mann-Whitney $p=0,0014$) (Figura 11). Esta associação já era esperada, uma vez que foi reportada por Munthe-Fog et al. (2009), onde a mutação num estado homozigótico conduz a uma ausência total de ficolina-3 no soro, e em estado heterozigótico, a cerca da metade da concentração sérica normal (MUNTHE-FOG et al. 2008, 2009; MICHALSKI et al. 2015). Em pacientes de câncer de ovário e controles, heterozigotos para a deleção (*C/Del*), também foram observados níveis de

ficolina-3 inferiores (em torno de 6500 ng/mL), em relação aos pacientes e controles homozigotos para o alelo mais comum (C/C) (em torno de 16000 ng/mL) (SZALA, 2013). Munthe-Fog et al. (2009) igualmente encontraram concentrações séricas de ficolina-3 menores em indivíduos saudáveis, heterozigotos (C/Del), os quais apresentaram mediana de 14,1 µg/mL. Este valor representa uma redução de cerca de 50% comparado à mediana em homozigotos (C/C), que foi de 27,5 µg/mL. No indivíduo homozigoto para a deleção (Del/Del), não foi detectada a presença da proteína (MUNTHE-FOG et al., 2009).

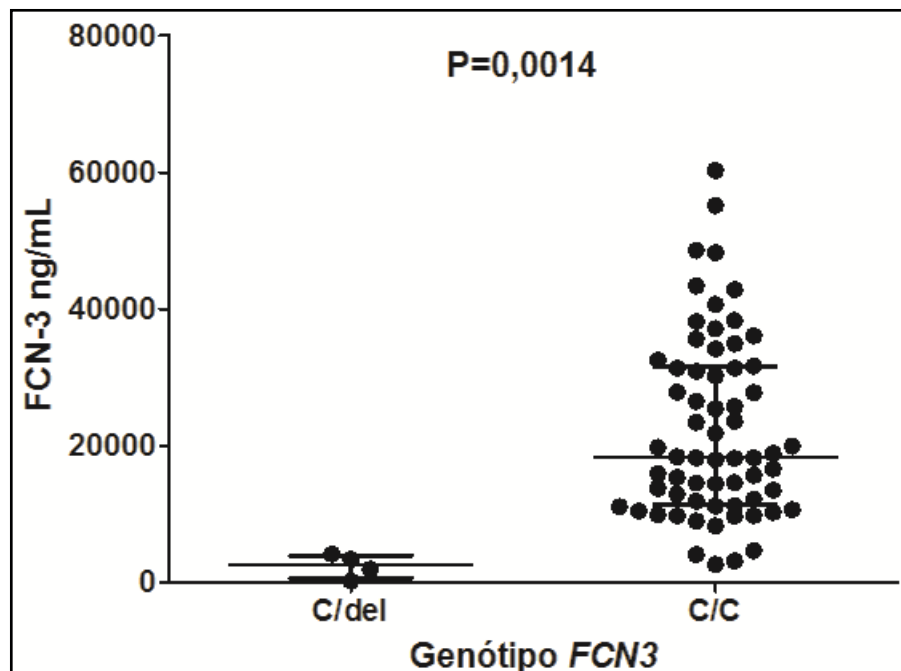


Figura 11: Comparação das concentrações de ficolina-3 em 68 controles, sendo 4 com a deleção.

4.2 Polimorfismo do intron 5 +3524_+3532del do *FCN3* (SNP rs28362807)

Realizou-se a genotipagem de 105 pacientes e de 169 controles. A deleção +3532del do intron 5 do gene *FCN3* foi encontrada na frequência de 177/210 ou 84% no total de pacientes e 237/338 ou 70% no total de controles (OR= 2,28 [IC95%= 1,47-3,54], $p=0,00015$) (Tabela 4). Ao separar controles e pacientes nos dois grupos étnicos, percebeu-se que a frequência observada da deleção (+3532del) é de aproximadamente 198/280 ou 71% em controles e 118/140 ou 84% em pacientes, ambos euro-descendentes. Já para os afrodescendentes, a frequência observada foi de aproximadamente 39/58 ou 67% em controles e 59/70 ou 84% em

pacientes (Figura 14). Sendo assim, *+3532del* apresentou-se associado com a susceptibilidade à doença, independente do grupo étnico (euro-descendentes OR=2,2 [IC95%=1,31-3,74], p=0,002), (afrodescendentes OR=2,61 [IC95%=1,12-6,08], p=0,035). As frequências alélicas são superiores às reportadas pelo projeto 1000 Genomas e HapMap (Tabela 4). A distribuição da frequência genotípica referente a esse loci nos pacientes afrodescendentes, diferentemente dos controles, não se apresentou em equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido à falta de heterozigotos (p=0,02).

Tabela 4. Frequência alélica do SNP em todos os pacientes de pênfigo foliáceo e controles.

Variante	Região	Alelos	Pacientes (N=210)	Controles (N=338)	Europeus (N=46)	Afro-americanos (N=48)
rs28362807	Intron 5	<i>+3524_+3 532del</i>	84,28%	70,11%	59%	67%
	Intron 5	<i>+3524_+3 532TATTT GGCC</i>	15,71%	29,88%	41%	33%

NOTA: para as populações europeia e afro-americana, os dados correspondem aos PGA-EUROPEAN-PANEL e PGA-AFRICAN-PANEL do NCBI, respectivamente.

LEGENDA: N= número de cromossomos.

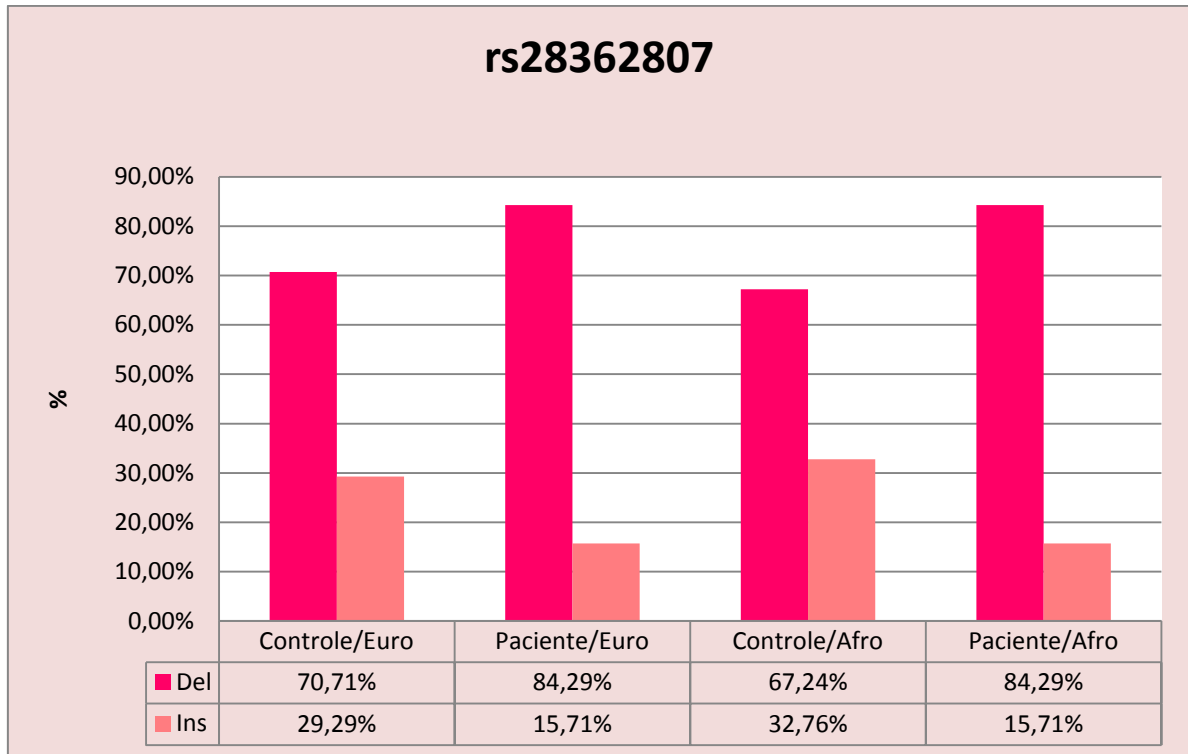


Figura 14: Frequências alélicas de rs28362807 do gene *FCN3* em controles e pacientes de pênfigo foliáceo.

NOTA: O valor de p para a diferença entre euro-descendentes foi igual a $p=0,002$ e entre afrodescendentes, $p=0,035$ (teste exato de Fisher). Número de cromossomos: Controle/Euro: 280; Paciente/Euro: 140; Controle/Afro: 58; Paciente/Afro: 70.

LEGENDA. Euro: euro-descendentes, Afro: afro-descendentes; Del: deleção; Ins: inserção.

Até o momento, não existem estudos de associação com doenças com este indel, sendo esta, a primeira associação a ser reportada na literatura.

4.3 Polimorfismo do intron 7 (SNP rs4494157) do *FCN3*

Para o SNP rs4494157 (+4479C>A) do intron 7 do gene *FCN3*, também foi realizada a genotipagem em 105 pacientes e 169 controles. As frequências observadas foram similares a outras populações, segundo os projetos 1000Genomes e HapMap (Tabela 5). A frequência encontrada do alelo +4479C foi de aproximadamente 181/210 ou 86% em pacientes e 246/338 ou 73% nos controles, ambos em relação ao número amostral total ($OR=2,48$ [$IC95\%=1,57-3,92$], $p=0,000067$) (Figura 15). Ao subdividir controles e pacientes em descendentes de europeus e africanos, observou-se que a frequência observada é de aproximadamente 203/280 ou 72% e 121/140 ou 86% em controles e pacientes euro-descendentes ($OR=2,41$ [$IC95\%=1,39-4,18$], $p=0,0012$) respectivamente, e

43/58 ou 74% e 60/70 ou 86% em controles e pacientes afrodescendentes ($p=0,11$), respectivamente (Figura 15). Portanto, o alelo +4479C apresenta-se associado à susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. Ao contrário dos resultados deste estudo, não houve associação entre este polimorfismo e a susceptibilidade a infecções respiratórias em crianças dinamarquesas (RUSKAMP et al., 2009).

Tabela 5. Frequência alélica do SNP em pacientes de pênfigo foliáceo e em controles.

SNP	Região	Alelos	Pacientes (N=210)	Controles (N=338)	Europeus (N=46)	Afro-americanos (N=48)
rs4494157	Intron 7	+4479 C	86,19%	72,78%	70%	91%
	Intron 7	+4479 A	13,80%	27,21%	30%	9%

NOTA: para as populações europeia e afro-americana, os dados correspondem aos PGA-EUROPEAN-PANEL e PGA-AFRICAN-PANEL do NCBI, respectivamente.

LEGENDA: SNP= polimorfismo de nucleotídeo único; N= número de cromossomos.

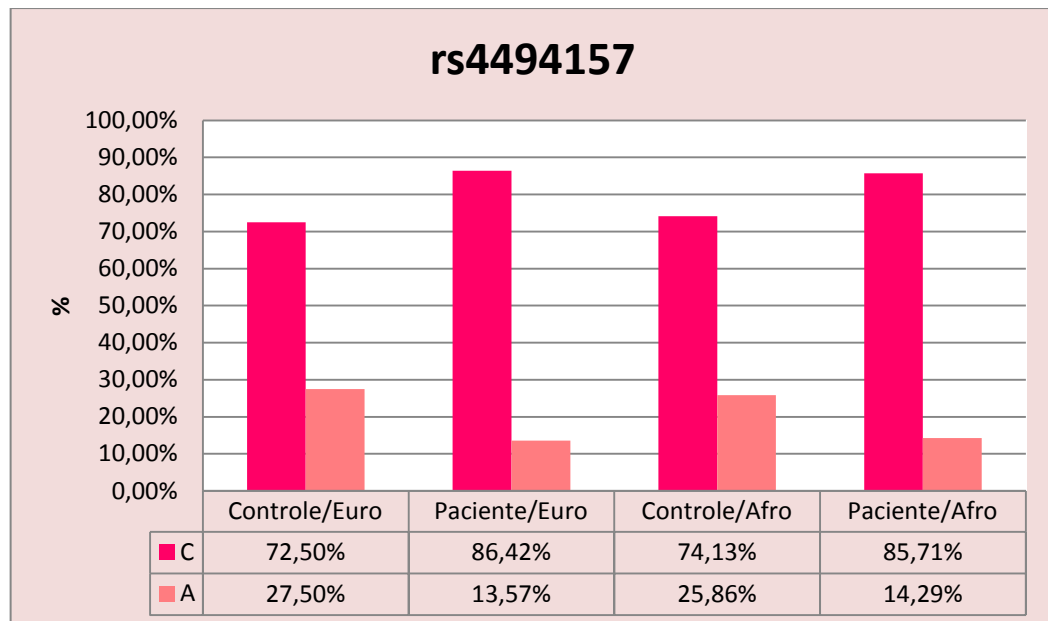


Figura 15: Gráfico que representa a frequência do SNP rs4494157 do gene *FCN3* em controles e pacientes de pênfigo foliáceo, ambos subdivididos em descendentes europeus e africanos.

NOTA: O valor de p para a diferença entre euro-descendentes foi igual a $p=0,0012$ e entre afrodescendentes, $p=0,11$ (teste exato de Fisher). Número de cromossomos: Controle/Euro: 280; Paciente/Euro: 140; Controle/Afro: 58; Paciente/Afro: 70.

LEGENDA. Euro: euro-descendentes, Afro: afro-descendentes.

4.4 Haplótipos de *FCN3*

Os haplótipos encontrados referentes aos três polimorfismos investigados foram: *CdelC*, *CinsA*, *CinsC*, *delinsA*, *deldelC*, *delinsC*. Suas respectivas frequências, de acordo com o grupo étnico, estão listadas na Tabela 6.

Tabela 6: Distribuição dos haplótipos em pacientes e controles de PF, de acordo como grupo étnico.

Haplótipo	Euro-descendentes			Afrodescendentes		
	Controles N=280	Pacientes N=140	p #	Controles N=58	Pacientes N=70	p #
<i>CdelC</i>	70,35%	82,85%	0,340	65,50%	80,00%	0,809
<i>CinsA</i>	27,50%	12,80%	0.0031*	25,86%	12,80%	0,104
<i>CinsC</i>	01,40%	02,10%	0,69	05,10%	01,40%	0,32
<i>delinsA</i>	00,00%	00,70%	0,33	00,00%	01,40%	1,0
<i>deldelC</i>	00,35%	01,40%	0,25	01,70%	04,20%	0,62
<i>delinsC</i>	00,30%	00,00%	1,0	01,70%	00,00%	0,45

LEGENDA: * significativo; Del=deleção, Ins=inserção, C=citosina, A=adenina. # teste exato de Fisher; N= número de cromossomos.

Nos grupos de euro e afrodescendentes, as associações encontradas com os polimorfismos isolados, refletiram-se na distribuição genotípica de haplótipos (Figura 16). No grupo total corrigido por regressão logística para idade e grupo étnico, portadores do haplótipo *CinsA* apresentaram-se associados com a resistência à doença (OR=0,44 [IC95%=0,24-0,80], p=0,007), assim como heterozigotos *CdelC/CinsA* (OR=0,49 [IC95%=0,26-0,92], p=0,028). Após correção, também permaneceu a associação entre homozigotos *CdelC/CdelC* e susceptibilidade à doença (OR=2,06 [IC95%=1,17-3,63], p=0,013).

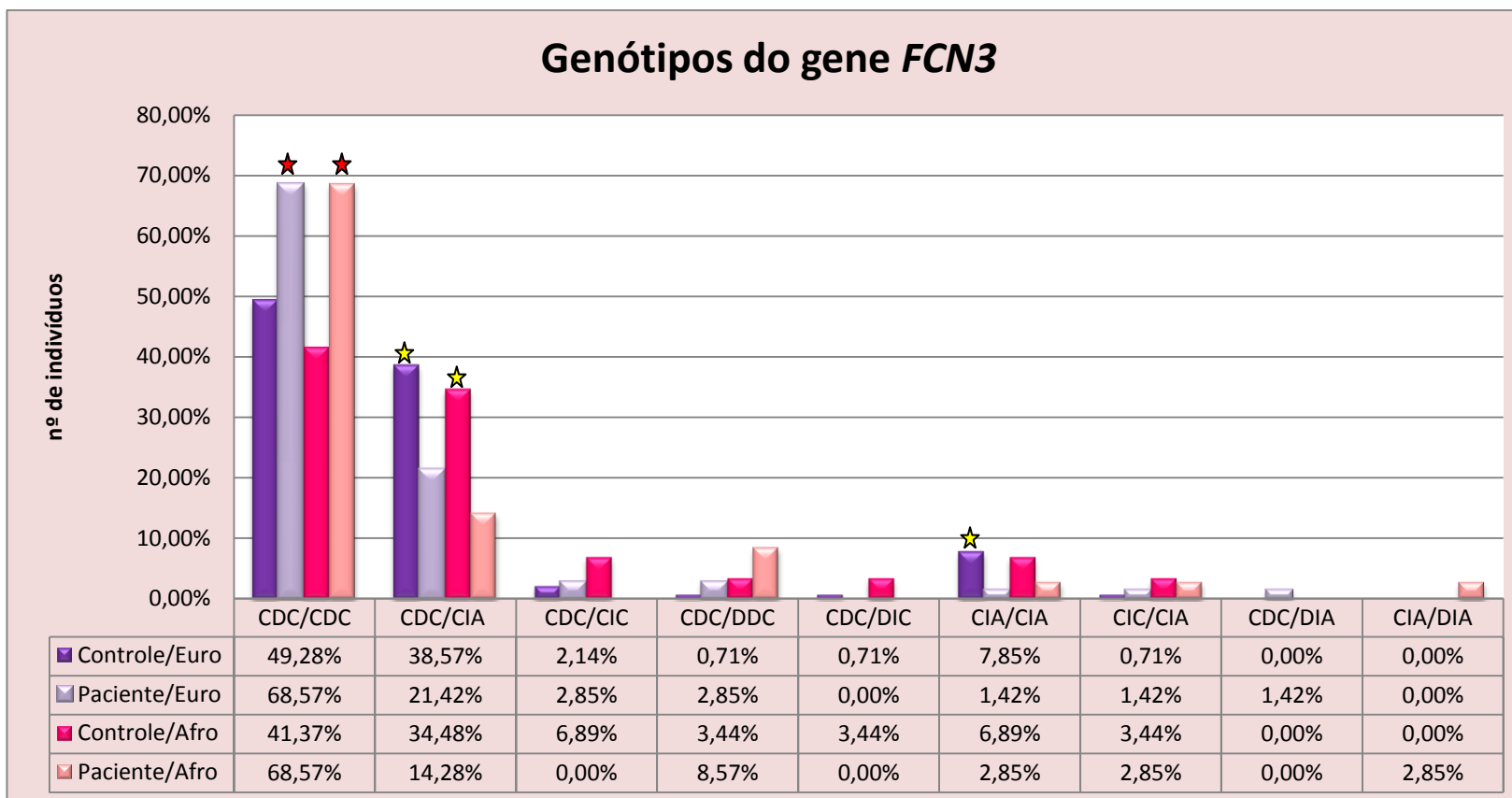


Figura 16: Distribuição dos genótipos de euro-descendentes (controles e pacientes) e afrodescendentes (controles e pacientes).
 NOTA: número de indivíduos: Controle/Euro: 140; Paciente/Euro: 70; Controle/Afro: 29; Paciente/Afro: 35. Segundo o teste exato de Fisher, o grupo dos euro-descendentes apresentou associação com o genótipo *CDC/CDC* (OR=2,24 [IC95%=1,22-4,10], p=0,008) relacionado com a susceptibilidade à doença e o genótipo *CDC/CIA* (OR=0,43 [IC95%=0,22-0,84], p=0,013) relacionado com a resistência à doença. Além disso, houve uma tendência do genótipo *CIA/CIA* (OR=0,16 [IC95%=0,02-1,34], p=0,065), relacionado com a resistência ao PF. Dentre os afrodescendentes houve associação do genótipo *CDC/CDC* (OR=3,09 [IC95%=1,10-8,63], p=0,04) relacionado a susceptibilidade ao PF e uma tendência do genótipo *CDC/CIA* (OR=0,32 [IC95%=0,09-1,07], p=0,08) relacionado com a proteção à doença. LEGENDA: CDC= *CdeIC*; CIA= *CinsA*; CIC= *CinsC*; DDC= *deldeIC*; DIC= *delinsC*; CIA= *CinsA*. As estrelas amarelas indicam associação ou tendência a resistência ao pênfigo foliáceo e as estrelas vermelhas indicam associação com a susceptibilidade a doença.

Interessantemente, os polimorfismos que estão envolvidos com a proteção ou a susceptibilidade a doença (rs28362807 do intron 5 e rs4494157 do intron 7) são os que poderiam alterar o processamento do pré-mRNA, pois com a presença de um determinado alelo, o gene poderia expressar preferencialmente apenas uma de pelo menos duas isoformas, uma com e a outra sem o exon 4 (FCN3-001 e FCN3-002).

O exon 4 é a região que codifica a região de ligação que antecede o domínio similar a fibrinogênio (FBG). Esta porção provavelmente deve faltar no transcrito alternativo sem o exon 4, e a sua ausência poderia interferir no desempenho do FBG em reconhecer resíduos acetilados (Figura 17). Assim, a presença preferencial de uma das isoformas poderia estar influenciando na susceptibilidade ou proteção a doença.

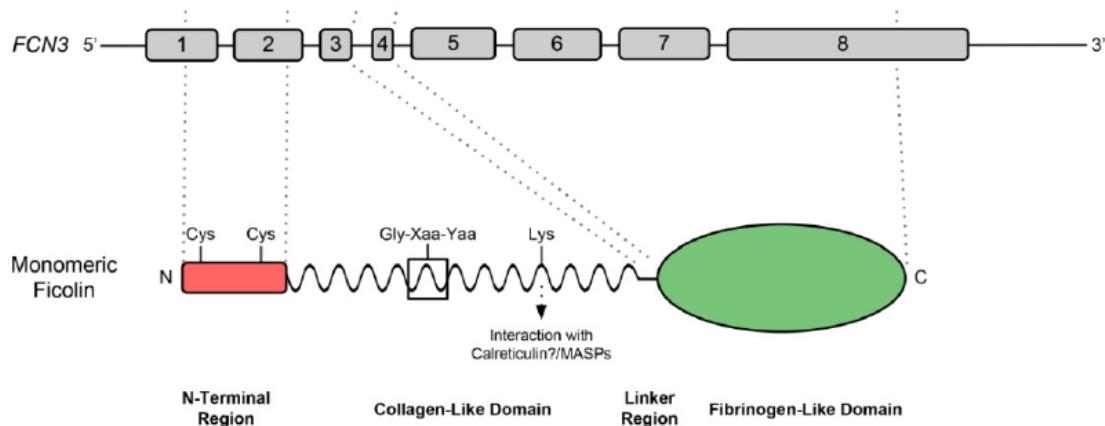


Figura 17: Ilustração da região que o exon 4 do gene *FCN3* codifica de sua respectiva proteína, a ficolina-3. FONTE: Mason *et al.*, 2015.

Ao levar em consideração o desequilíbrio de ligação, foi verificado se há ligação dos SNPs em estudo com outros polimorfismos que, possivelmente, poderiam causar um efeito carona nos que foram estudados neste trabalho. Por meio da ferramenta LDPlot do programa SNAP (<http://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldplot.php>), observou-se que o SNP +4479C>A do intron 7 (rs4494157) está ligado a outros cinco SNPs na população europeia (figura 18). Já na população africana, percebe-se que o SNP rs4494157 encontra-se isolado (figura 19). Portanto, como houve associação entre este SNP e a doença nas duas populações (euro-descendentes e afrodescendentes), pode-se concluir que, provavelmente, o rs4494157 é um polimorfismo causal. Não houve informações equivalentes no programa, para a deleção investigada no intron 5.

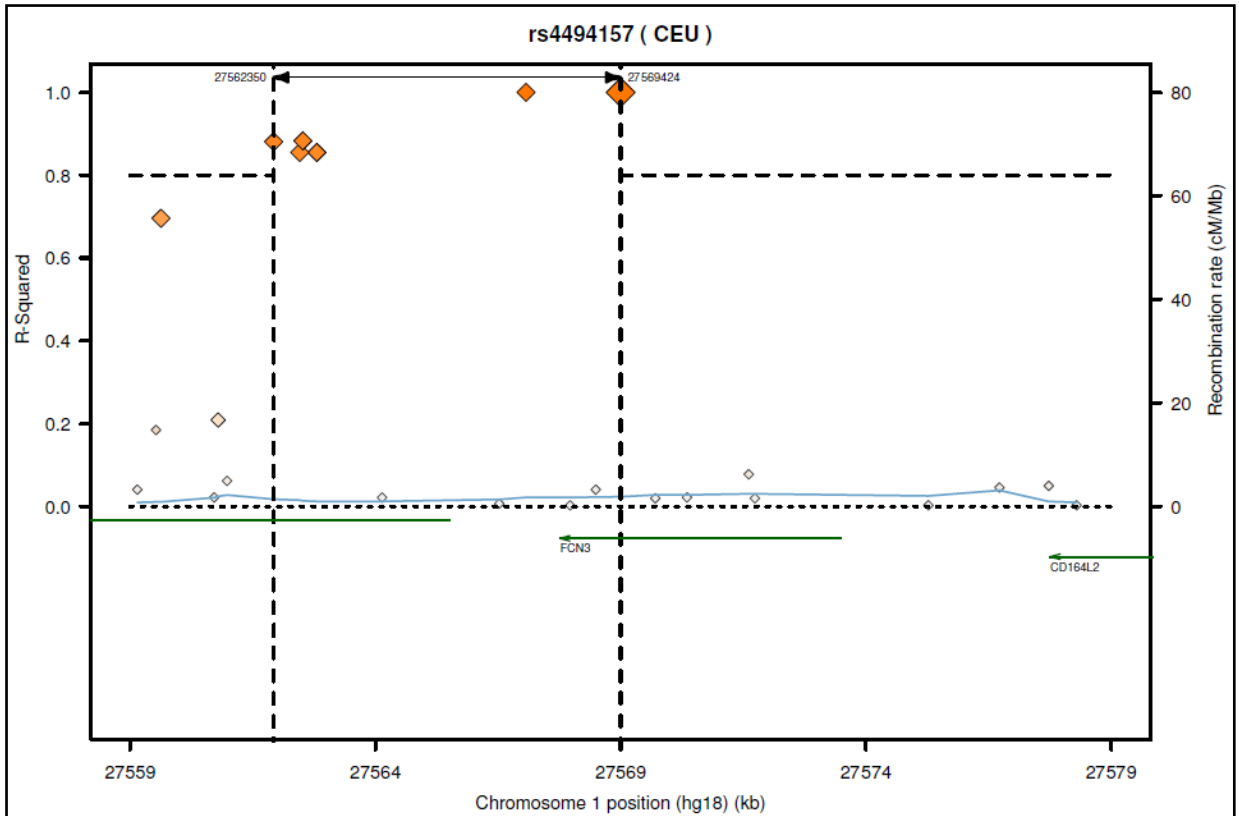


Figura 18: Desequilíbrio de ligação do rs4494157 com outros SNPs na população europeia.

NOTA: Os SNPs em desequilíbrio de ligação com o rs4494157 são: rs4970521, rs4307592, rs4525067, rs12727507, rs4075731.

FONTE: Imagem obtida no site SNAP (<http://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldplot.php>)

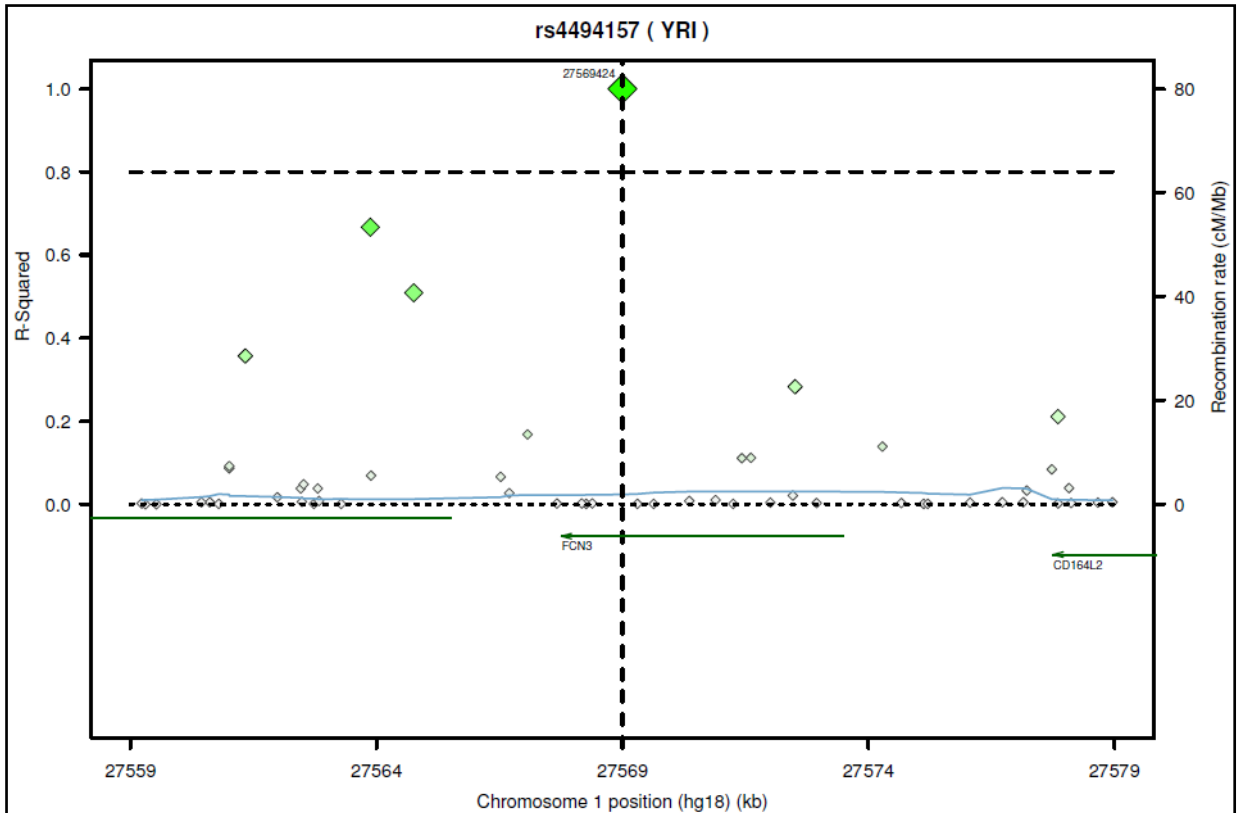


Figura 19: Desequilíbrio de ligação do rs4494157 em uma população africana (Yoruba).

FONTE: Imagem obtida no site SNAP (<http://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldplot.php>)

4.5 Associações dos haplótipos com a concentração de ficolina-3 em controles

Não houve uma associação entre os genótipos dos haplótipos encontrados com as concentrações de ficolina-3 em controles (Figura 20). Contudo, ao aumentar o número amostral com as amostras de pacientes de hanseníase (quantificadas previamente em outro estudo do grupo do Laboratório de Imunopatologia Molecular), cujos níveis não diferiam dos controles por genótipo pesquisado, observou-se que indivíduos *CinsA/CinsA* apresentaram uma maior concentração de ficolina-3 no soro, com a média de 38626 µg/mL. Por outro lado, *CDeIC/CDeIC* e *CDeIC/CInsA* apresentaram as seguintes médias: 20233 µg/mL e 26211 µg/mL, respectivamente ($p=0,015$) (Figura 21).

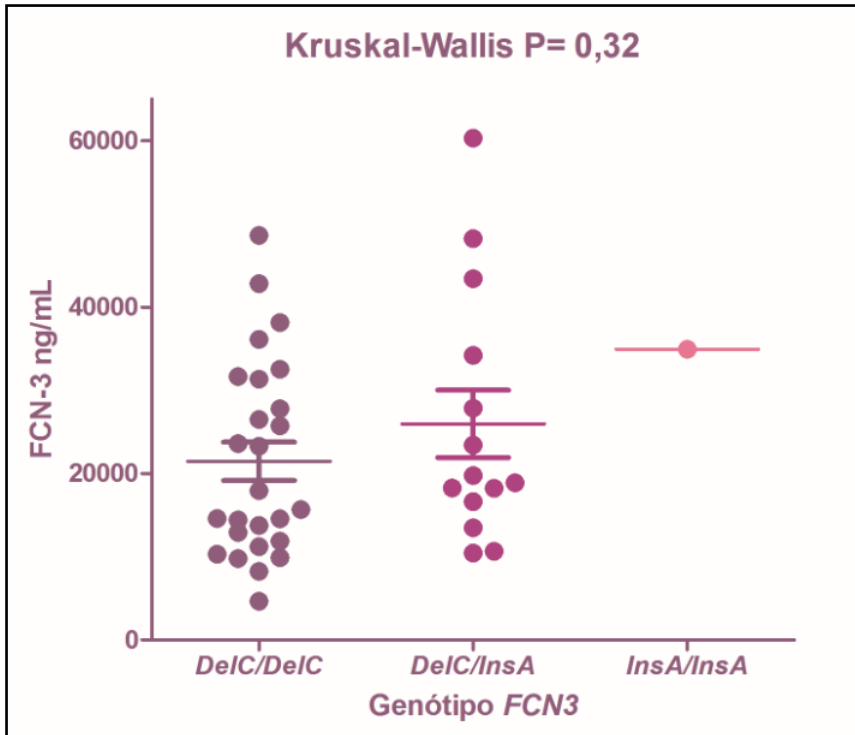


Figura 20: Concentrações de ficolina-3 em relação aos genótipos nos controles.

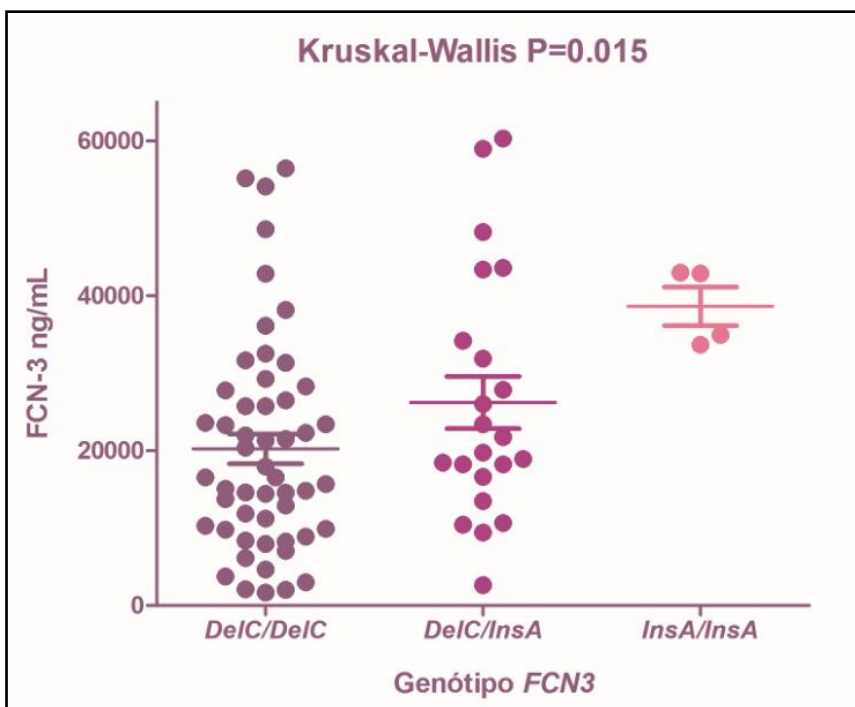


Figura 21: Concentrações de ficolina-3 em relação aos genótipos na amostra reunida de controles e pacientes de hanseníase.

4.6 Correlações entre os níveis de ficolina-3 e de outras proteínas da via das lectinas

Dentre as amostras, 68 haviam sido previamente quantificadas para FCN-3 (ficolina-H), 30 para FCN-2 (ficolina-L), 35 para MASP-3 e 58 para MASP-2. Houve correlação negativa entre FCN-3 e FCN-2 (Spearman $R=-0,40$, $P=0,026$) (Figura 12), sugerindo que na falta de uma proteína (FCN-3) a outra (FCN-2) agiria de forma compensatória. Segundo Szala et al. (2013), os níveis séricos de ficolina-2 e ficolina-3 em indivíduos controles e com câncer de ovário são correlacionados positivamente, embora de forma pouco intensa ($R= 0,217$, $p= 0,006$ e $R= 0,347$; $p= 0,0003$, respectivamente). Provavelmente, os resultados diferem devido ao pequeno número de amostras simultaneamente quantificadas para FCN-2 e FCN-3 na presente pesquisa ($N=30$), enquanto Szala et al. (2013) quantificaram 128 pacientes de câncer de ovário e 197 controles para ambas proteínas. Além disso, técnicas de ELISA diferentes, talvez usando anticorpos diferentes, foram utilizadas para quantificar as concentrações das proteínas no soro. No presente estudo, utilizou-se o kit de ELISA HK340 – Hycult Biotech e no de Szala et al. (2013), uma técnica previamente descrita por Swierzko et al. (2007).

Também houve correlação negativa entre FCN-3 e MASP-3 (Spearman $R=-0,50$, $P=0,002$) (Figura 13), possivelmente com efeito regulador sobre FCN-2 (MASP-3 bloqueia a ativação do complemento). Como MASP-3 está mais associada à FCN-3 do que a qualquer outra proteína iniciadora da via das lectinas (SKJOEDT et al., 2010), pode ser que baixas concentrações de FCN-3 acarretem em mais MASP-3 livre para detecção pelo ELISA. Por fim, não houve correlação com MASP-2.

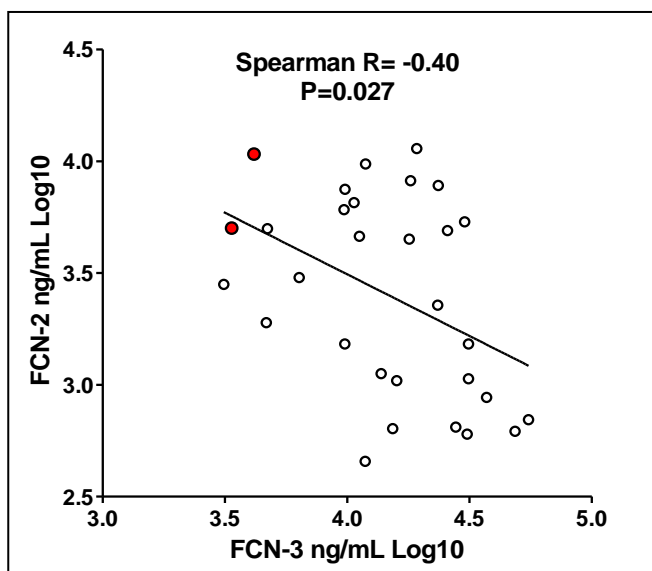


Figura 12. Correlação entre os níveis de FCN-3 e FCN-2.

LEGENDA: Em vermelho: indivíduos heterozigoto *C/Del*. Valores em log10.

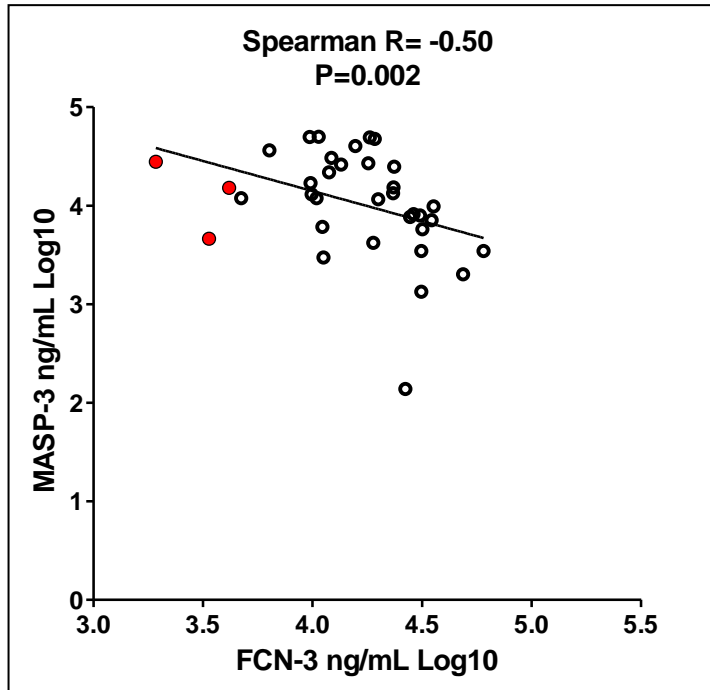


Figura 13: Correlação entre os níveis de FCN-3 e MASP-3.

LEGENDA: Em vermelho: indivíduos heterozigoto *C/Del*. Valores em log10.

5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho a relatar uma associação com haplótipos de variantes intrônicas de *FCN3* com uma doença. De fato, encontrou-se um efeito dominante do haplótipo *CinsA*, associado com concentrações mais elevadas da proteína no soro, com a resistência à doença. Ao contrário, homozigotos *CdelC/CdelC* estão associados com susceptibilidade dobrada ao pênfigo, tanto em euro-, quanto em afrodescendentes, independentemente da idade. Esta associação oposta pode ser devida a alterações no processamento do pré-mRNA, causada pelas variações intrônicas que flanqueiam o exon 4, e não a um efeito carona com outros polimorfismos ligados. Embora baixas concentrações de FCN-3 possam ser compensadas com concentrações mais elevadas de FCN-2, também há o aumento de MASP-3, o que pode significar maior bloqueio da ativação do complemento

(MASP-3 é um antagonista da via). Logo, polimorfismos de *FCN3* parecem regular a concentração da proteína no soro e a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. Este trabalho terá continuidade com a tipagem de outro grupo controle, o qual corresponde a um grupo da região endêmica; além da quantificação de FCN-3 nos pacientes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, tradução da 7ª edição, cap. 4, p. 73, 74, 2012.

ALI, Y.M. et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. **PLoS Pathog**, v.8, n.7. 2012.

ALMEIDA H.L.; LEITÃO A.H.; ROSSI G.; ROCHA N.M.; MARQUES S. R.; Scanning electron microscopy of acantholysis in pemphigus foliaceus. **An Bras Dermatol**. 2013;88(3):456-8.

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

AOKI, V.; et al. Perfil histórico da imunopatogenia do pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem) Historical profile of the immunopathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 3, p. 287-92, 2005.

BELTRAME M. H.; CATARINO S. J.; GOELDNER I.; BOLDT A. B. W.; MESSIAS REASON I. J. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, p. 148, 2015.

BOLDT A.B. W.; GOELDNER I.; MESSIAS-REASON I.J. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. **Adv Clin Chem**. v.56, p.105-153, 2012.

BOLDT A.B. W.; GOELDNER, I.; STAHLKE, E. V. R. S.; THIEL, S.; JENSENIUS, Jens; MESSIAS-REASON, I.J.T.; Leprosy Association with Low MASP-2 Levels Generated by MASP2 Haplotypes and Polymorphisms Flanking MAP19 Exon 5. **Plos One**, v. 8, p. e69054, 2013.

BRAUN-PRADO K., VIEIRA MION A.L., FARAH P.N., CULPI L., PETZL-ERLER ML (2000) HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens** 56: 417–427.

CAMPBELL I.; Reis V.; Aoki V.; Cunha P.; Hans Filho G.; Alves G.; et al. Pênfigo foliáceo endêmico/Fogo Selvagem. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 2001;76:13-31.

CULTON, D. A. *et al.* Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 31, p. 311-324, 2008.

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

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; et al. Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **The Journal of investigative dermatology**, v. 92, n. 1, p. 4-12, jan 1989.

EXCOFFIER L.; LISCHER H. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Arlequin; 2011.

GARRED, P.; HONORÉ, C.; MA, Y. J.; RORVIG, S.; COWLAND, J.; BORREGAARD, N.; HUMMELSHOJ, T. The genetics of ficolins. **Journal of innate immunity**, 2(1), 3-16, 2009.

GONCALVES, GA.; BRITO, MMC.; SALATHIEL, AM.; FERRAZ, TS.; ALVES, D.; ROSELINO, AMF. Incidência do pênfigo vulgar ultrapassa a do pênfigo foliáceo em região endêmica para pênfigo foliáceo: análise de série histórica de 21 anos. **An Bras Dermatol**. 2011;86(6):1109-12.

GRANDO, S. A. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. **Autoimmunity**, v. 45, n. February, p. 7–35, 2012.

HONORE, C.; et al. The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. **Arthritis Rheum.**, v. 56, n. 5, p. 1598-1607, 2007.

HUMMELSHOJ, T.; MUNTHE-FOG, L.; MADSEN, H.O.; SIM, R.B.; GARRED, P. Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen). **Mol. Immunol.** 45, 1623–1632, 2008.

JOHNSON, A. D.; HANDSAKER, R. E.; PULIT, S.; NIZZARI, M. M.; O'DONNELL, C. J.; de Bakker P. I.; W. SNAP. A web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap Bioinformatics, 24(24):2938-2939, 2008.

JONES, J. C.; ARNN, J.; STAEHELIN, L. A.; GOLDMAN, R. D. Human autoantibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 9, p. 2781-5, maio 1984.

KAWANA S., GEOGHEGAN W.D., JORDON R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. II. Complement enhanced detachment of epidermal cells. **Clin Exp Immunol** v.61, p.517–525, 1985.

KAWANA, S., GEOGHEGAN, W.D., JORDON, R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. III. Altered epidermal cell membrane integrity mediated by pemphigus antibody and complement. **J. invest. Dermatol.** V. 86, n. 29. 1986

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

KRARUP, A.; et al. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. **Infect.Immun.**, v. 73, n. 2, p. 1052-1060, 2005.

KURAYA, M.; et al. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. **Immunobiology**, v. 209, n. 9, p. 689-697, 2005.

LAPIERE, J.C. *et al.* Preferential activation of the complement system in the lower epidermis of patients with pemphigus vulgaris. **Br J Dermatol.**, v. 139, n. 5, p. 851-854, 1998.

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A.; et al. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). "The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research". **The Journal of investigative dermatology**, v. 98, n. 6, p. 847-50, jun 1992.

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

MANIATIS, T.; et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

MASON, Christopher P.; TARR, Alexander W. Human Lectins and Their Roles in Viral Infections. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2229-2271, 2015.

MESSIAS IT, et al. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.14 p.51–55, 1989.

MESSIAS-REASON I. J., BOLDT A. B., MORAES BRAGA A. C., VON ROSEN SEELING S. E., DORNELLES L., PEREIRA-FERRARI L., KREMSNER P. G., KUN J. F. The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. **Journal of Infectious Diseases**. v.196, p.1379 - 1385, 2007.

MESSIAS-REASON I.; et al. Circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 in endemic pemphigus foliaceus. **Clin Exp Dermatol**. v.33, n.4, p.495-497, 2008.

MESSIAS-REASON, I. J. T.; NISIHARA, R. M.; MOCELIN, V. Mannan-binding lectin and Ficolin deposition in skin lesions of pemphigus. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 7, p. 521–525, 2011.

MICHALSKI, M.; ŚWIERSKO, A. ST.; PAŁOWSKA-KLIMEK, I.; et al. Primary Ficolin-3 deficiency – Is it associated with increased susceptibility to infections? **Immunobiology**, p. 1–3, 2015.

MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; LAZARO, A.; et al. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue antigens**, v. 49, n. 1, p. 35-40, jan 1997.

MUNTHE-FOG, L.; et al. Characterization of a polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a Ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state. **Molecular immunology**, v. 45, n. 9, p. 2660-2666, 2008.

MUNTHE-FOG, L.; et al. Immunodeficiency associated with FCN3 mutation and ficolin-3 deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 25, p. 2637-2644, 2009.

MUNTHE-FOG, L.; HUMMELSHOJ, T.; HONORÉ, C.; MOLLER, M. E.; SKJOEDT, M. O.; PALSGAARD I.; BORREGAARD N.; MADSEN, H. O.; GARRED, P. Variation in FCN1 affects biosynthesis of ficolin-1 and is associated with outcome of systemic inflammation. **Genes Immun.** v.13, n.7, p.515-522, 2012.

MUNTHE-FOG, L.; et al. Immunodeficiency associated with FCN3 mutation and ficolin-3 deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 25, p. 2637-2644, 2009.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. O sistema complemento e a imunidade inata. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, a. p. 61- 81, 2010.

NCBI – National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=532781899. Acessado dia 11/11/2015)

OLIVEIRA, L. C. Estudo de associação entre polimorfismos e níveis séricos do receptor 1 do complemento e o pênfigo foliáceo. 2015. 108 páginas. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

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

PAVONI, D. P.; CERQUEIRA, L. B.; ROXO, V. M. M. S.; PETZL-ERLER, M. L. Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, n. 9, p. 1227-32, set 2006.

PEREIRA, N. F.; HANSEN, J. A.; LIN, M.T.; et al. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, n. 6, p. 233-41, 21 dez 2004.

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

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

PINCERATI, M. R.; DALLA-COSTA, R.; PETZL-ERLER, M. L. CTLA4CT60 gene polymorphism is not associated with differential susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 442-4, jul 2010.

PROHÁSZKA, Z.; et al. Association of ficolin-3 with severity and outcome of chronic heart failure. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60976, 2013.

PROBST C.M., BOMPEIXE E.P., PEREIRA N.F., DE O.D.M., VISENTAINER J.E. et al. (2000) HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Hum Biol** 72: 597–617.

RIBEIRO, A. M. Q. *et al.* The profile of fogo selvagem (endemic pemphigus foliaceus) at the University hospital of Brasilia – Brazil. Epidemiological and clinical considerations. **International journal of dermatology**, v. 44, p. 293-298, 2005.

ROXO, V. M. M. S.; PEREIRA, N. F.; PAVONI, D. P.; et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus--are there any associations? **Tissue Antigens**, v. 62, n. 5, p. 394-400, nov 2003.

RUSKAMP, J. M.; HOEKSTRA, M. O.; POSTMA, D. S.; et al. Exploring the role of polymorphisms in ficolin genes in respiratory tract infections in children. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 155, p. 433–440, 2009.

SCHLAPBACH, L. J.; et al. Congenital H-ficolin deficiency in premature infants with severe necrotising enterocolitis. **Gut**, v. 60, n. 10, p. 1438-1439, 2011.

SKJOEDT, M. O.; PALARASAH, Y.; MUNTHE-FOG, L.; et al. MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation. **Immunobiology**, v. 215, n. 11, p. 921–931, 2010. Elsevier.

SMEDBRÅTEN, Y. V. et al.; High Ficolin-3 Level at the Time of Transplantation Is an Independent Risk Factor for Graft Loss in Kidney Transplant Recipients. **Transplantation**, v. 99, n. 4, p. 791-796, 2015.

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. **Fundamentos de genética**. Guanabara koogan, 2008.

STANLEY, J. R.; KLAUS-KOVTUN, V.; SAMPAIO, S. A. Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris autoantibodies. **The Journal of investigative dermatology**, v. 87, n. 2, p. 197-201, ago 1986.

SUGIMOTO, R.; et al. Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 33, p. 20721-20727, 1998.

SZALA, A.; et al. Ficolin-2 and ficolin-3 in women with malignant and benign ovarian tumours. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 62, n. 8, p. 1411-1419, 2013.

THOMSEN, T.; SCHLOSSER, A.; HOLMSKOV, U.; SORENSEN, G. L. "Ficolins and FIBCD1: Soluble and membrane bound pattern recognition molecules with acetyl group selectivity". **Molecular Immunology**, vol. 48, n. 4, p. 369 – 381, 2011.

XIA, P. *et al.* Complement fixation by pemphigus antibody. V. Assembly of the membrane attack complex on cultured human keratinocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 6, p. 1939-1947, 1988.

