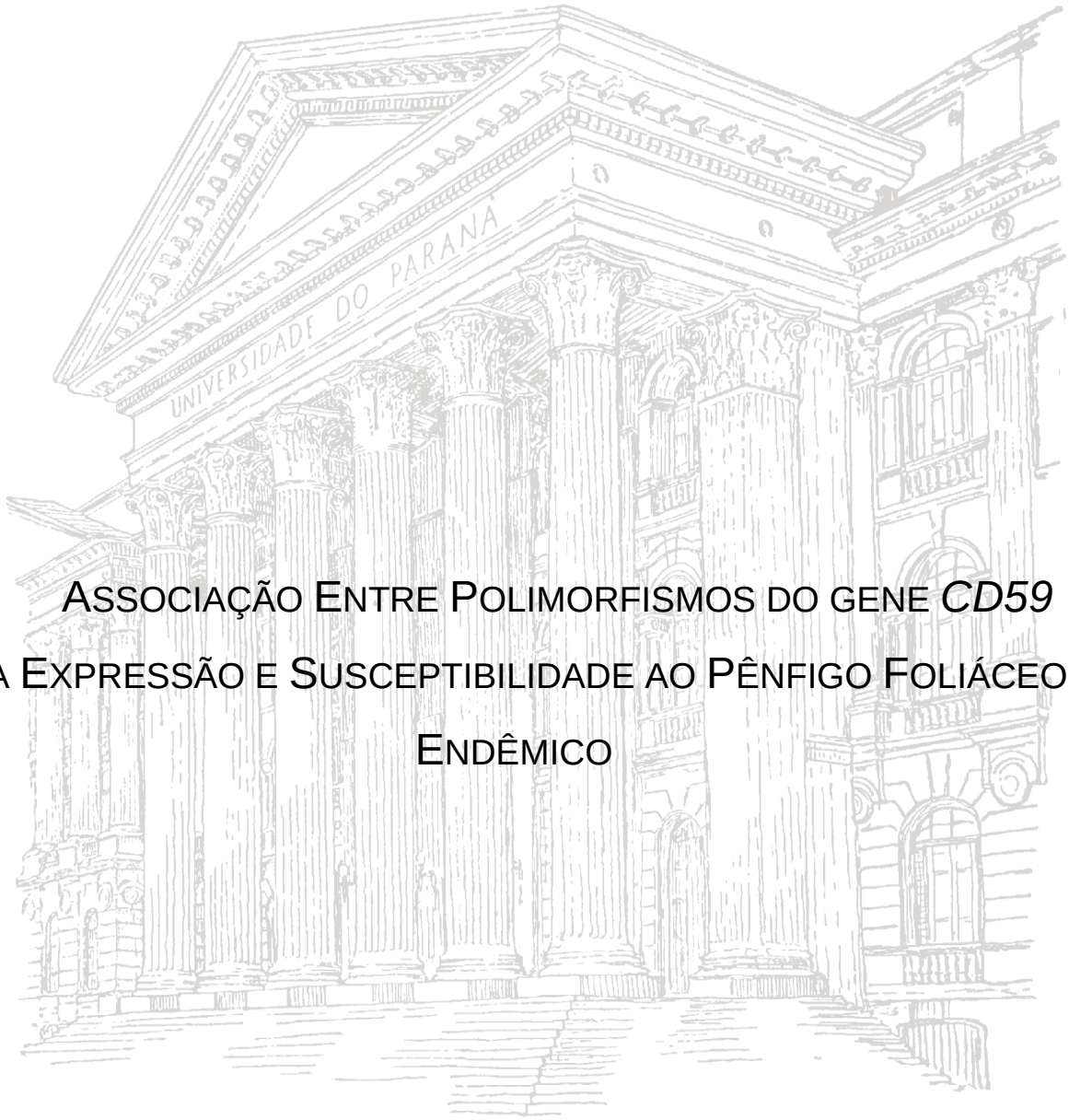
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA SALVIANO DA SILVA



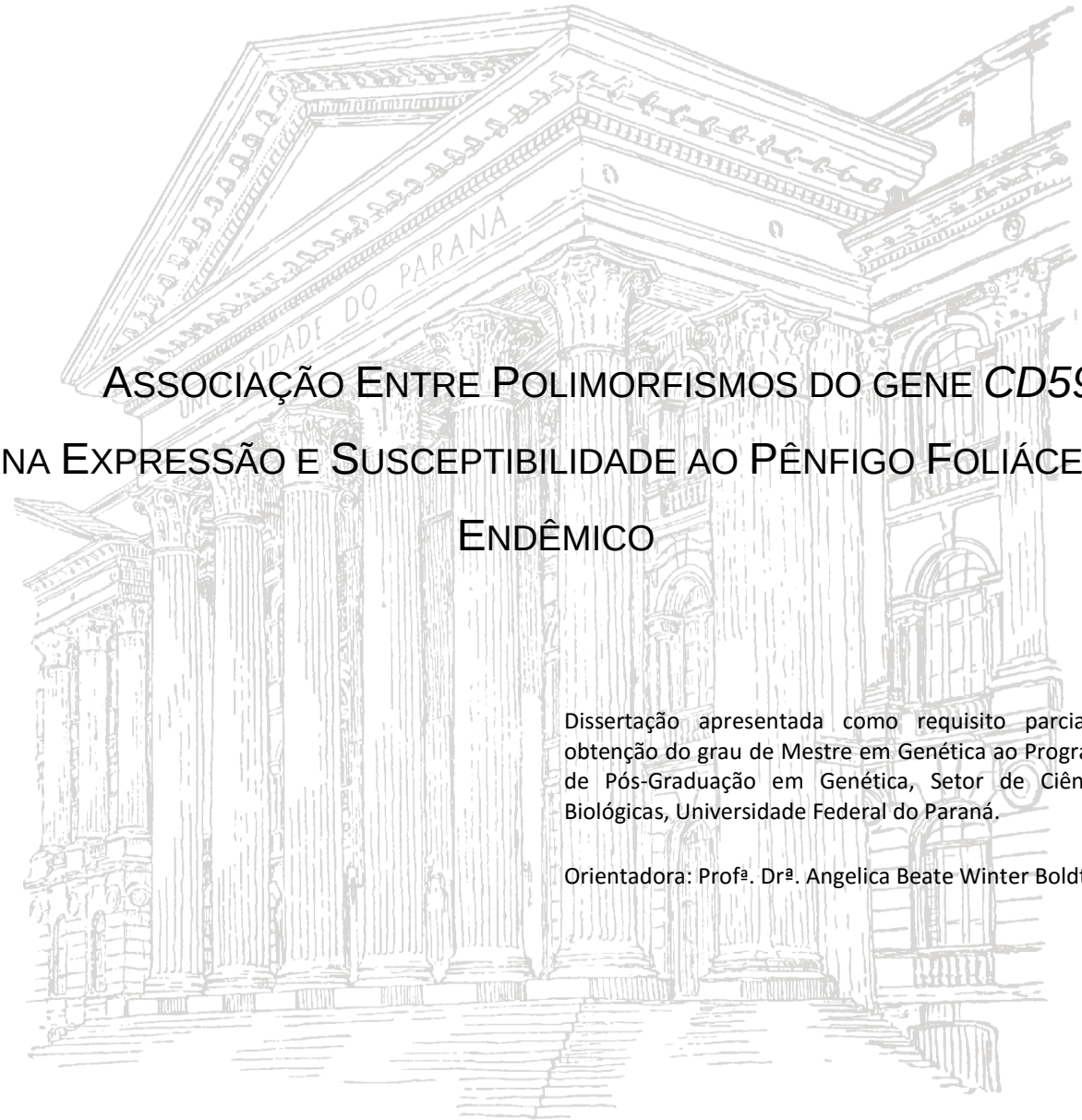
ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *CD59* NA EXPRESSÃO E SUSCEPTIBILIDADE AO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

Curitiba – PR

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA SALVIANO DA SILVA



ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *CD59* NA EXPRESSÃO E SUSCEPTIBILIDADE AO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

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

Orientadora: Profª. Drª. Angelica Beate Winter Boldt

Curitiba – PR

2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **AMANDA SALVIANO DA SILVA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética são de parecer que se aprove a candidata.
Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 31 de março de 2016

Doutora Shirley Ramos da Rosa Utiyama
Universidade Federal do Paraná - Membro Titular

Doutora Márcia Regina Pincerati
Universidade Positivo - Membro Titular

Doutora Angelica Beate Winter Boldt
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto

Lupe Furtado Alle
Coordenadora do PPG-GEN / UFPR
Matrícula 200309

Doutora Lupe Furtado Alle
Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

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

Scanned by CamScanner

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aqueles a quem devo tudo: meus queridos pais. Irrefutavelmente, são as pessoas mais lindas e primordiais em minha vida. Por todos os ensinamentos, e pela formação do que sou hoje e de como devo sempre ser. Por todo o amor incondicional, preocupação e carinho, tão únicos. Por todo o esforço e competência, em cada detalhe de cada esfera, para que eu chegasse até aqui. Por todas as incontáveis ajudas, e por saber que sempre que precisar poderei contar com mais uma. Por toda a sede pela minha felicidade. Enfim, por simplesmente serem os melhores do mundo. Maria Iva e Jivanildo, amo muito vocês!

A minha orientadora Angélica, por ter me acolhido em seu grupo, me dado a oportunidade dessa fase em minha vida e me guiado durante todo esse tempo. Por toda a dedicação, ensinamentos, conselhos, confiança, carinho e paciência.

A professora Maria Luiza, coordenadora do LGMH e responsável por todas as conquistas obtidas ali. Com ela aprendi e me aprofundei em muitas coisas relacionadas à imunogenética, e também sobre o que é ser uma mulher de extrema competência no universo científico, e como eu gostaria de ser futuramente.

As professoras Karin e Dani, que não apenas fizeram parte da banca de acompanhamento deste projeto, como também me ensinaram muito e auxiliaram diversas vezes.

Aos colegas do LGMH, que fizeram parte do meu dia a dia no laboratório, tornando a rotina mais prazerosa. Não há como negar a importância do espírito de amizade e companheirismo que existe no grupo, onde cada um acompanha os estresses e felicidades de cada um, ensinando o que sabem e ajudando como podem. Além de, é claro, o ritmo descontraído dos mesmos. Ao Danilo, o “guru” do laboratório, sempre com ótimas ideias e ajudando prontamente em qualquer problema; à Carol M., que mesmo após sua mudança para os EUA, sempre me senti a vontade de pedir auxílio, e que sempre respondia em e-mails enormes com todas as explicações detalhadas e mais um pouco, além das extrações de RNA, cDNA, e boa parte do DNA que utilizamos em nosso trabalho; ao Gabriel, colega de sala que me identifiquei bastante, e que com sua agradável e divertida companhia, já me passou muito conhecimento; à Verónica, Ticiana, Sara, Luana e Gabriela,

colegas divertidíssimas e bastante prestativas, por todos os conselhos, auxílios, acompanhamentos e esclarecimentos; e à Débora Lemos, que com toda a sua sensibilidade, sempre se aproximou para saber se estava tudo bem e como andava meu trabalho. Essa enfermeira, que terá um lindo futuro acadêmico, não apenas me ensinou grande parte de qPCR e suas análises, como também parece ter sempre compreendido de fato, o meu lado pessoal e psicológico nos últimos meses. Sou muito grata!

Diante da beleza de guiar alguém, me sinto honrada pela oportunidade de ter “co-orientado” a Nicole K., tentando ensiná-la ao máximo o pouco que eu sabia. Essa futura biomédica, que também terá um futuro brilhante, me auxiliou com parte deste projeto, e portanto, também é reponsável por essa minha conquista.

A todos os meus grandes amigos, que nos finais de semana me divertem, me escutam, me salvam do estresse e me dão forças para enfrentar as dificuldades. E mesmo os que não moram em Curitiba, me ajudam torcendo por mim, se preocupando, e aconselhando sempre que possível, mesmo que de longe.

E é claro, aos pacientes de Pênfigo Foliáceo que colaboraram com este estudo, contribuindo para o andamento da compreensão desta doença, que tanto os faz sofrer.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune endêmica em áreas rurais brasileiras e caracterizada por acantólise e autoanticorpos contra antígenos desmossomais (particularmente a Desmogleína 1), acompanhado da ativação do sistema complemento e formação de bolhas epidermais dolorosas, de acometimento localizado ou generalizado. A proteína CD59 é uma importante reguladora da cascata do complemento, inibindo a formação do complexo de ataque à membrana e protegendo as células da lise, além de mediar transduções de sinais e ativação de linfócitos T, sendo sua deficiência envolvida em diversas doenças autoimunes. *CD59* possui diferentes transcritos por processamento alternativo, dos quais apenas dois são amplamente expressos nos tecidos, o que sugere a presença de sítios altamente regulatórios em suas regiões não codificantes, com provável influência nas isoformas. Contudo, não há nenhum estudo associando polimorfismos de regiões não codificantes de *CD59* em doenças autoimunes, demonstrando que apesar de sua importância, ainda se trata de um gene pouco explorado. Neste estudo, foram investigados seis polimorfismos não codificantes de *CD59* com um possível efeito no processamento alternativo e na expressão gênica: rs861256, rs831625, rs831629, rs704701, rs1047581 e rs704697. Estes SNPs foram haplotipados em 157 pacientes e 215 controles por PCR sequência-específica, e a expressão gênica foi avaliada em 82 indivíduos saudáveis por PCR em tempo real. O alelo *G* de rs861256 foi associado com o aumento da expressão gênica (P=0,024) e a susceptibilidade ao PF em mulheres (OR=4,11, P=0.0001), que também foram mais propensas a desenvolver lesões do tipo generalizadas (OR=4,3, P=0,009) e apresentar maior dificuldade de atingir a remissão (OR=3,7, P=0,045). Também foram observadas associações genéticas para o alelo *G* de rs831625 (OR=3,1, P=0,007) e *A* de rs704697 (OR=3,4, P=0,006) em mulheres euro-brasileiras, e para o alelo *C* de rs704701 (OR=2,33, P=0,037) em afro-brasileiros de ambos os sexos. Estes alelos constituem o haplótipo *GGCCAA*, que também leva ao aumento da susceptibilidade ao PF (OR=4,9, P=0,045). Portadores dos haplótipos *GG*, *CC* e *AA* (em cis ou em trans) apresentam maior expressão de mRNA (P=0,037), especialmente as mulheres (P=0.029). Em conclusão, maiores níveis transcricionais de *CD59*, por consequência de uma expressão gênica mais elevada ou da ausência de degradação do mRNA, parecem estar relacionados com a susceptibilidade ao PF, especialmente em mulheres. Este envolvimento pode ser devido a alterações transcricionais, levando a um excesso de isoformas não ideais, ou ainda ao papel de CD59 na transdução de sinais de células T e liberação de citocinas. Estas hipóteses devem ser posteriormente investigadas em estudos funcionais e com maior número amostral.

Palavras-chave: Pênfigo foliáceo, CD59, polimorfismos, sistema complemento.

ABSTRACT

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease, endemic in Brazilian rural areas and characterized by acantholysis and autoantibodies against desmosomal antigens (particularly desmoglein 1), accompanied by complement system (CS) activation and painful epidermal blisters, with generalized or localized affection. CD59 protein is an important regulator of the complement cascade, inhibiting formation of the membrane attack complex and protecting the cells from destruction, in addition to mediate signal transductions and activation of T lymphocytes, and its deficiency involved in several autoimmune diseases. CD59 has different transcripts by alternative splicing, of which only two are widely expressed in tissues, suggesting the presence of highly regulatory sites in their noncoding regions, with probable influence on isoforms. However, there is no study involving polymorphisms in *CD59* noncoding regions in autoimmune diseases, demonstrating that despite its importance, it is still a relatively unexplored gene. In the present study, we investigated six *CD59* noncoding polymorphisms with a possible effect in alternative splicing and gene expression: rs861256, rs831625, rs831629, rs704701, rs1047581 and rs704697. These SNPs were haplotyped in 157 patients and 215 controls by PCR-SSP, and gene expression was evaluated in 82 healthy subjects by real-time RT-PCR. The *G* allele of rs861256 was associated with increased gene expression (P=0.024) and PF susceptibility in women (OR=4.11, P=0.0001), which were also more prone to develop generalized lesions (OR=4.3, P=0.009) and to not experience disease remission (OR=3.7, P=0.045). Genetic associations were also observed for the *G* allele rs831625 (OR=3.1, P=0.007) and *A* of rs704697 (OR=3.4, P=0.006) in Euro-Brazilian women, and for *C* allele of rs704701 (OR=2.33, P=0.037) in Afro-Brazilians of both sexes. These alleles constitute *GGCCAA* haplotype, which also leads to increased PF susceptibility (OR=4.9, P=0.045). Carriers of haplotypes *GG*, *CC* and *AA* (in cis or trans) have higher mRNA expression (P=0.037), especially women (P=0.029). In conclusion, higher transcriptional levels of *CD59*, for consequence of a higher gene expression or absence of mRNA degradation, seem to be related with susceptibility to PF, especially in women. This involvement may be due to transcriptional changes, leading to an excess of non-ideal isoforms, or to the CD59 role in T cell signal transduction and in cytokines release. This hypothesis should be further investigated in functional studies and the association results, replicated in independent cohorts with increasing sample sizes.

Keywords: Pemphigus foliaceus, CD59, polymorphisms, complement system

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais proteínas caderinas presentes no desmossomo..... 15
FIGURA 2 - Diferenças entre PV e PF..... 16
FIGURA 3 - Manifestações clínicas de pacientes com PFE..... 17
FIGURA 4 - Regiões brasileiras endêmicas para o PFE..... 19
FIGURA 5 - Casa típicas de locais com maior incidência de PFE..... 20
FIGURA 6 - Diagnóstico imunológico de PFE, por imunofluorescência indireta..... 21
FIGURA 7 - Estrutura da Dsg1 e domínios reconhecidos pelos autoanticorpos do pênfigo foliáceo..... 27
FIGURA 8 - Formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) nas células alvo..... 30
FIGURA 9 - Etapas da cascata do Sistema Complemento e de seus reguladores 34
FIGURA 10 - Mecanismos de regulação do SC, por DAF e CD59..... 35
FIGURA 11 - A inibição estrutural do MAC pela ligação do CD59 ao C5b-8..... 36
FIGURA 12 - Estrutura tridimensional da forma secundária da proteína CD59 humana..... 37
FIGURA 13 - Localização do gene CD59 no braço curto do cromossomo 11..... 43
FIGURA 14 - Transcritos de CD59 situados em regiões alternativas..... 45
FIGURA 15 – Níveis de expressão gênica de CD59 em diferentes tecidos..... 46
FIGURA 16 - Diferentes transcritos de CD59 e níveis de expressão tecidual..... 47
FIGURA 17 - Ilustração esquemática do transcrito de CD59, com a localização dos SNPs investigados e a o polipeptídio formado..... 48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Diferentes transcritos do gene CD59..... 43
TABELA 2 - Polimorfismos de CD59 investigados e suas frequências populacionais..... 50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO 14

2.1.1 A doença e seus aspectos clínicos 14

2.1.2 Epidemiologia 17

2.1.3 Diagnóstico e tratamento 20

2.1.4 Etiopatogenia 22

2.1.4.1 Fatores ambientais 22

2.1.4.2 Fatores genéticos e imunogenéticos 23

2.1.4.3 Fatores genéticos e imunogenéticos 26

2.2 SISTEMA COMPLEMENTO 28

2.2.1 A cascata do sistema complemento 28

2.2.2 Desregulação do complemento e doenças 30

2.2.2.1 Complemento e o pênfigo 31

2.2.3 Reguladores do complemento 33

2.3 PROTEÍNA CD59 35

2.3.1 Estrutura e função 35

2.3.2 CD59 e exossomos 39

2.3.3 CD59 e doenças 40

2.4 GENE *CD59* 42

2.4.1 Estrutura e expressão 42

2.4.2 Polimorfismos gênicos 49

3 HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA 52

4 OBJETIVOS 53

4.1 OBJETIVO GERAL 53

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 53

5 ARTIGO 54

Abstract 55
Introduction 56
Metodology 57
Results 61
Discussion 63
References 65

6 DISCUSSÃO FINAL 84

7 CONCLUSÕES 87

REFERÊNCIAS 88

APÊNDICE 100

ANEXOS 104

1. INTRODUÇÃO

O pênfigo é um grupo de doenças autoimunes, caracterizado pela ação de autoanticorpos que reconhecem antígenos de adesão na superfície dos desmossomos, levando à ruptura das ligações intercelulares. Este processo é conhecido como acantólise e se manifesta formando bolhas em regiões cutâneas ou mucosas do epitélio, com acometimento localizado ou generalizado. O pênfigo do tipo foliáceo (PF) possui como autoantígeno a Desmogleína 1, um componente do desmossomo expresso principalmente na camada superficial do epitélio (BYSTRYN e RUDOLPH, 2005; DIAZ et al., 1989). Em regiões rurais brasileiras, o PF possui uma variante endêmica, que não difere em aspectos clínicos, chamada de Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE), doença popularmente conhecida como fogo selvagem ou pênfigo foliáceo brasileiro (BYSTRYN e RUDOLPH, 2005; DIAZ et al., 1989).

Por ser uma doença rara e complexa, ainda não estão bem elucidados seus mecanismos etiopatológicos, mas sabe-se que se trata de uma patologia de caráter multifatorial, onde fatores genéticos, imunológicos e ambientais estão envolvidos (CULTON et al., 2008). O diagnóstico pode ser feito através de manifestações clínicas, técnicas histológicas e imunológicas. O tratamento atualmente empregado não é específico, e consiste principalmente no uso de corticosteroides, gerando diversos efeitos colaterais (CAMPBELL et al., 2001; BYSTRYN e RUDOLPH, 2005).

Há diversos genes associados à susceptibilidade ao PFE, e outros à proteção contra esta doença, como alguns alelos da superfamília de genes *HLA*, *IL-6*, *CD40* e *CD40L*, entre outros (AOKI et al., 2011; MEYERA e MISERY, 2010; MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009; PEREIRA et al., 2004). Recentemente, também foram encontradas associações genéticas com o regulador do complemento *CR1*, demonstrando a participação dessa cascata nos mecanismos patológicos do PFE (OLIVEIRA et al., 2015).

Sabe-se que a ligação patogênica antígeno-anticorpo ativa inapropriadamente o sistema complemento, de forma que ocorre a deposição de seus componentes líticos (como C3, C5, C9 e MAC) nos espaços intercelulares, como observado no processo de acantólise (MESSIAS-REASON et al., 2011; KAWANA et al., 1989). A associação entre C5b-8 e polímeros de C9 forma o complexo de ataque à membrana (MAC), que leva a formação de poros na membrana das células alvo, lisando-as. Dentre os importantes reguladores do sistema complemento, atua nesta etapa a proteína CD59 (KIMBERLEY et al., 2007), sendo a sua deficiência atualmente associada a diversas doenças autoimunes (KINDERLERER et al., 2006; RUIZ-ARGÜELLES et al., 2007; DELGADO et al., 2009; ALEGRETTI et al., 2009; HUANG et al., 2007; ACOSTA et al., 2000; KIMBERLEY et al., 2007).

CD59 é um potente regulador da etapa final do SC, impedindo a ligação de C5b-8 com C9, e consequente formação do MAC na membrana celular, protegendo assim, as células homólogas dos efeitos lesivos dessa cascata (KIMBERLEY et al., 2007; ALEGRETTI et al., 2009). Também possui um importante papel na ativação, adesão e transdução de sinal em células T (DECKERT et al., 1992), ativação de neutrófilos mediada por tirosina-quinase (VAN DEN BERG et al., 1995) e indução de morte celular (MONLEON et al., 2000). Contudo, apesar de sua importância, trata-se de um gene ainda pouco explorado, sendo os polimorfismos presentes em suas regiões não codificantes ainda não investigados em doenças autoimunes.

Devido à ação desregulada do sistema complemento em muitas doenças autoimunes, e devido ao papel fundamental que a proteína CD59 exerce na regulação desta cascata, sugere-se que polimorfismos presentes em determinadas regiões não codificantes do gene *CD59* possam interferir na regulação e no processamento alternativo deste gene, podendo acarretar em variações na expressão gênica e/ou na eficiência funcional desta proteína, levando a um aumento da susceptibilidade ao PFE. Apesar dessa hipótese, não há nenhum estudo realizado até hoje relacionando o papel da proteína CD59 ao

pênfigo foliáceo, e tampouco de polimorfismos não codifcantes deste gene em uma doença autoimune.

Por este motivo, este estudo tem como objetivo analisar se há associação entre os polimorfismos rs861256, rs831625, rs831629, rs704701, rs1047581 e rs704697 do gene *CD59*, com os níveis de expressão gênica e com a susceptibilidade ao PFE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

2.1.1 Aspectos Clínicos

O pênfigo é um grupo de doenças que se caracteriza pela presença de bolhas e erosões na região cutânea e/ou mucosa, causados por autoanticorpos antiepidermais. Esta doença, apesar de rara, é bastante séria e complexa, e faz parte dos quatro principais grupos de doenças bolhosas autoimunes (AIBD) (DIAZ et al., 1989 ; SINHA, 2011).

Os autoanticorpos patogênicos reconhecem determinados antígenos de superfície dos queratinócitos, presentes na região do desmossomo e pertencentes à família das Caderinas, que são moléculas de adesão dependentes de cálcio (CAMs). Dentre estas importantes glicoproteínas de adesão e comunicação celular, destacam-se as desmogleínas, desmocolinas, desmoplaquinas, placoglobinas, placofilinas, entre outras (FIGURA 1), sendo as desmogleínas já bem estabelecidas nos mecanismos patológicos do pênfigo. A desmogleína é uma glicoproteína localizada na membrana dos queratinócitos, que medeia a interação com proteínas intracelulares, ligando o citoesqueleto de queratina da célula com a superfície celular, permitindo força e resistência ao estresse mecânico sofrido pelo epitélio. A ruptura dessas ligações intercelulares ocasiona a perda de adesão entre os queratinócitos e a formação de bolhas intraepidermais, processo este conhecido como acantólise e bastante característico na doença (HERTL et al., 2006; TAKEICHI, 1991; CULTON et al., 2008; NISIHARA et al., 2003).

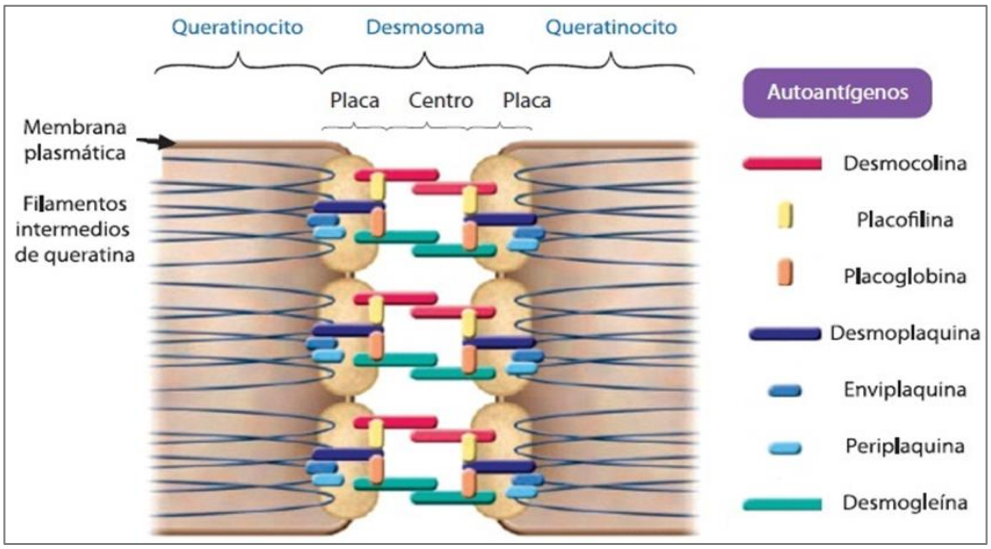


FIGURA 1. Principais proteínas caderinas presentes no desmossomo. Possuem função de adesão entre os queratinócitos e caracterizam-se como autoantígenos no pênfigo. FONTE: adaptado de HERTL et al. (2006).

A forma profunda do pênfigo é caracterizada pelo pênfigo vulgar e pênfigo vegetans, e a forma superficial é caracterizada pelo pênfigo foliáceo e pênfigo eritematoso. Contudo, os tipos clássicos e mais comuns da doença são o pênfigo foliáceo e o pênfigo vulgar (BYSTRYN e RUDOLPH, 2005).

O pênfigo foliáceo (PF) e o pênfigo vulgar (PV) diferem entre si de acordo com a região da pele afetada, sintomas e antígenos alvo (FIGURA 2). O principal autoantígeno associado ao PF é a Desmogleína 1 (Dsg1), e visto que esta proteína está presente na lâmina superficial do epitélio, as bolhas se desenvolvem logo abaixo do estrato córneo, superficialmente na pele, sendo raras ou ausentes em regiões mucosas. Já o PV está associado com a presença de autoanticorpos principalmente contra a Desmogleína 3 (Dsg3), uma proteína presente em camadas mais profundas do epitélio, caracterizando-se por bolhas que se desenvolvem abaixo da camada basal, ocorrendo tanto na pele quanto em mucosas (BYSTRYN e RUDOLPH, 2005; AMAGAI et al., 1999; MAHONEY et al., 1999).

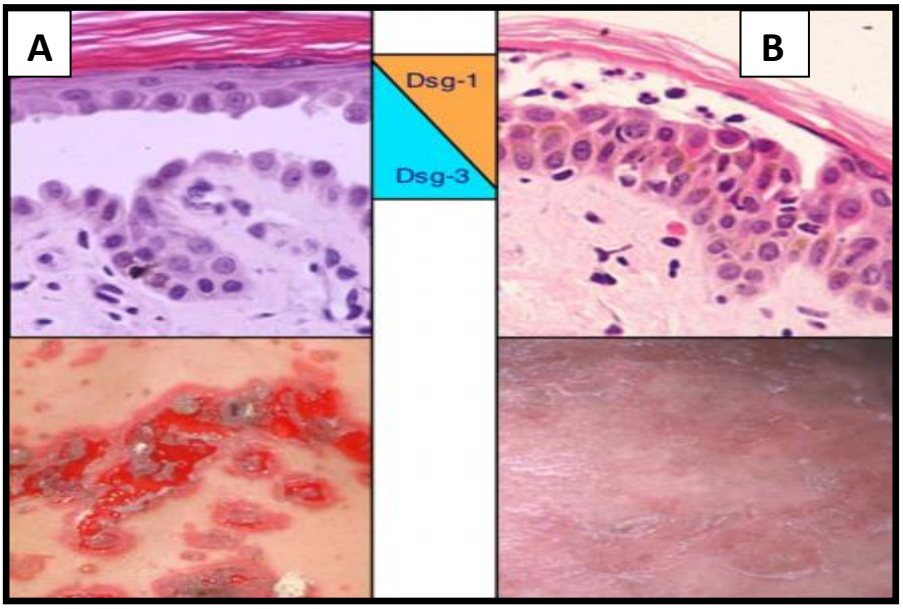


FIGURA 2. Diferenças entre PV e PF. LEGENDA: (A) O PV caracteriza-se pelo auto reconhecimento de Dsg-3, presente nas camadas mais profundas da epiderme. Acantólise e formação de bolhas profundas. (B) O PF caracteriza-se pelo auto reconhecimento de Dsg-1, presente em camadas mais superficiais. Acantólise e formação de bolhas na superfície do epitélio. FONTE: KITAJIMA e AOYAMA (2007).

No Brasil, há ainda uma outra forma de PF, o Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE), ou mais popularmente Fogo Selvagem, que difere por possuir caráter endêmico em algumas regiões brasileiras. Em pacientes com a doença ativa (FIGURA 3), as lesões primárias se caracterizam por pequenas bolhas hiperpigmentadas situadas em áreas seborreicas, predominantemente na região da cabeça (em especial na face e couro cabeludo), pescoço e tronco superior. São raras as lesões na cavidade oral, porém estas podem ocorrer superficialmente. As bolhas se rompem facilmente, formando crostas, e são agravadas por diversos fatores, como a exposição excessiva ao sol. Em pacientes com a doença mais agressiva, as lesões podem se estender para o restante do tronco, braços e pernas. Em geral, estes pacientes sentem prurido, dor e sensação de queimação, pela excessiva descamação da pele (DIAZ et al., 1989; BYSTRYN e RUDOLPH, 2005).

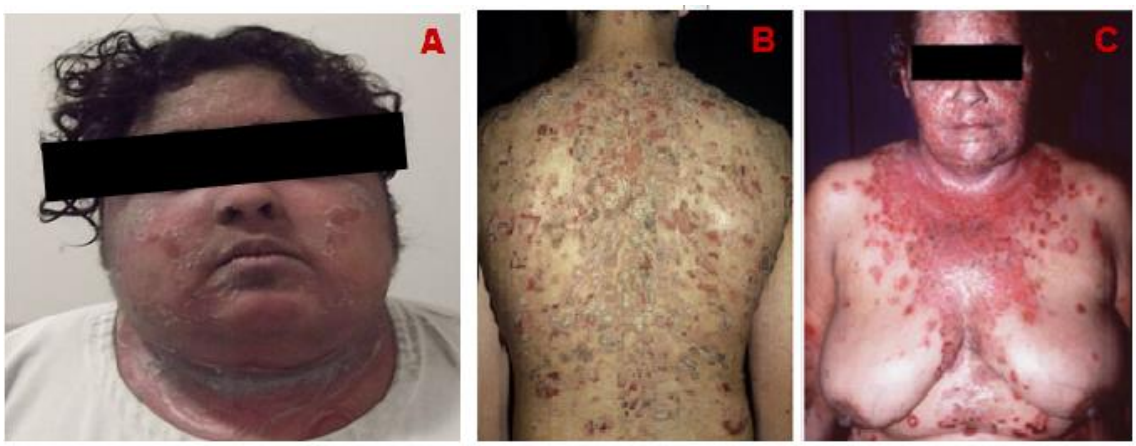


FIGURA 3. Manifestações clínicas de pacientes com PFE. LEGENDA: (A) Bolhas generalizadas na região da face e pescoço de adolescente com PFE. O inchaço pelo corpo é um efeito característico da corticoterapia. FONTE: banco de dados do Laboratório de Genética Molecular Humana – UFPR. (B e C) Pacientes de PFE com bolhas generalizadas por todo o corpo, especialmente na região do tronco. FONTE: adaptado de DIAZ et al. (1989) e de CULTON et al. (2008).

Na gravidez, devido aos anticorpos patogênicos serem transferidos da mãe para o filho pela placenta, o pênfigo está associado ao risco de morte fetal, partos prematuros, e presença da doença na criança após o nascimento (BYSTRYN e RUDOLPH, 2005).

2.1.2 Epidemiologia

O Pênfigo possui incidência mundial de 0,75-5 casos/milhão por ano, ocorrendo de forma esporádica na Europa e Estados Unidos. No Brasil, a forma endêmica do PF (PFE) acomete áreas de clima subtropical, entre 500 e 800 metros de altitude, principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (FIGURA 4). Também foram descritos casos de endemismo em alguns países da América do Sul, como Colômbia e Peru, e também na Tunísia (BYSTRYN e RUDOLPH, 2005; DIAZ et al., 1989; MEYERA e MISERY, 2010; DIAZ et al., 1989 [2]). Trata-se de uma doença autoimune relacionada com

a exposição a antígenos ambientais, estando presente em áreas rurais, entre 10 a 15 quilômetros de rio ou córrego e com alta frequência de insetos simulídeos, popularmente conhecidos como “borrachudos” (*Simulium nigrimanum* é a espécie mais citada, dentre as suspeitas). Além dos simulídeos, também há uma forte suspeita do envolvimento da espécie *Lutzomyia longipalpis* no PFE. As condições ecológicas de distribuição da doença são semelhantes às da doença de Chagas e leishmaniose. De fato, alguns pacientes com estas doenças também apresentam autoanticorpos contra Dsg1 (QUIAN et al., 2012; AOKI, et al., 2011; MEYERA e MISERY, 2010; CULTON et al., 2008). A frequência do PFE é predominante em populações de baixa renda, surgindo em crianças, adolescentes e adultos jovens, atingindo o pico de incidência entre a segunda e terceira décadas de vida. O aumento dos casos ocorre entre o final da época de chuva (setembro e março) e começo da época seca (abril e agosto). Não foi reportada predisposição sexual ou racial para a doença (AOKI et al., 2011; KORMAN, 1988; DIAZ et al., 1989 ;MEYERA e MISERY, 2010; CULTON et al., 2008).

O PFE foi primeiramente descrito no Brasil na região da Mogiana, uma área de desmatamento situada na divisa do estado de São Paulo com Minas Gerais. Dentro de poucos anos foram reportados novos casos em Belo Horizonte (MG), em regiões de plantações de coco na Bahia, e também muitos casos em Franca, no interior de São Paulo. Quando o estado de São Paulo passou a se desenvolver de forma acelerada, aumentando o índice de desmatamento, houve o surgimento de muitos novos casos de PFE na década de 30, o que motivou a construção de um hospital na cidade de São Paulo, especificamente para o tratamento desta doença. Anos depois, hospitais para o tratamento de PFE também foram construídos em Goiânia (GO) e em Campo Grande (MS) (DIAZ et al., 1989; DIAZ et al., 1989 [2]; HANS-FILHO et al., 1999).

FIGURA 4. Regiões brasileiras endêmicas para o PFE. LEGENDA: Os pontos designam a distribuição geográfica de pacientes com PFE, cuja maior concentração está nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná. FONTE: DIAZ et al. (1989 [2]).

No Mato Grosso do Sul, há uma reserva da população indígena Terena, conhecida como Limão Verde, com uma população de aproximadamente 1200 indivíduos e alta incidência de PFE. Apresenta 1 a 4 novos casos de PFE por ano, sendo que o primeiro caso registrado foi em 1979. O *Simulium nigrimanum*, raramente encontrado em regiões não endêmicas, está presente nesta reserva, e as casas são tipicamente com paredes de adobe e telhados de palha, como visto na FIGURA 5 (AOKI et al., 2011). Outras reservas Terena no MS possuem uma incidência baixa de PFE, e diferem da Limão Verde em aspectos geográficos e ecológicos (WARREN et al., 2000; PINHEIRO e FRANCO, 2014).

FIGURA 5. Casa típica de locais com maior incidência de PFE.
FONTE: AOKI et al. (2011).

2.1.3 Diagnóstico e tratamento

Há três estágios do PFE, de acordo com sua evolução: estágio agudo, em que a doença se manifesta em até 6 semanas; crônico, que dura mais de 6 semanas; recorrente, onde as lesões desaparecem, porém tendem a retornar depois de algum tempo; ou curado, quando não há manifestações clínicas do PFE por mais de 12 meses (RIBEIRO et al., 2005).

O diagnóstico do PFE pode ser feito através de manifestações clínicas (erosões e bolhas na pele), técnicas histológicas (presença de acantólise epidermal) e imunológicas (presença de anticorpos contra Dsg1, por ensaios de imunofluorescência indireta no soro ou por imunofluorescência direta em biópsias de pele) (FIGURA 6) (CAMPBELL et al., 2001; BYSTRYN e RUDOLPH, 2005).

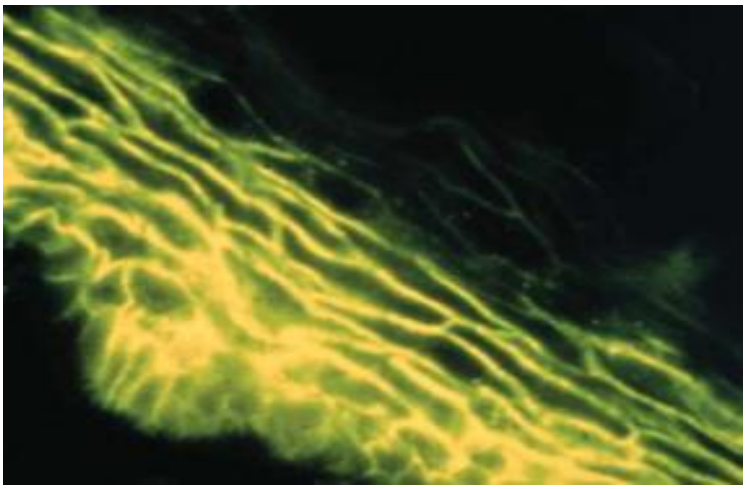


FIGURA 6. Diagnóstico imunológico de PFE, por imunofluorescência indireta, mostrando depósitos de IgG intercelulares. FONTE: AOKI et al. (2005).

Se não tratado, podem ocorrer graves complicações e até mesmo a morte. Fatores como a idade em que se iniciam as lesões, início do tratamento e nível de atividade da doença, estão relacionados com sua progressão e com o prognóstico dos pacientes (CAMPBELL et al., 2001; BYSTRYN e RUDOLPH, 2005).

O tratamento atual é longo e utiliza corticosteroides tópicos, orais ou ainda intralesionais. Podem ser administrados coadjuvantes em associação, como imunossupressores, anti-inflamatórios e antibióticos. Porém, essas opções terapêuticas não são específicas para PFE e variam de paciente para paciente, além da ocorrência de diversos efeitos colaterais, como desenvolvimento de infecções intestinais, hipertensão, hiperglicemia, aumento de peso, osteoporose, gastrite, úlcera gastrintestinal e surtos psicóticos (CAMPBELL et al., 2001). Além disso, o uso de corticosteroides está associado com infecções extracutâneas por patógenos oportunistas, como fungos, vírus e bactérias, principalmente por *Staphylococcus aureus* (BYSTRYN e RUDOLPH, 2005; KORMAN, 1988).

2.1.4 Etiopatogenia

A etiopatogenia do PFE é multifatorial, visto que fatores ambientais, genéticos e imunológicos estão envolvidos. Trata-se de uma doença complexa, cujo surgimento depende das seguintes etapas: contato com agentes ambientais infecciosos; susceptibilidade genética do indivíduo; ativação de células T e B auto reativas com anticorpos específicos para Dsg1; destruição da Dsg1 através da ligação destes autoanticorpos em sítios específicos, e separação dos desmossomos (acantólise), levando à formação de bolhas (CULTON et al., 2008).

2.1.4.1 Fatores Ambientais

Como já citado, os principais agentes infecciosos suspeitos na patogênese do PFE são algumas espécies de insetos hematófagos, encontrados em regiões rurais e próximas a rios, que coincidem com as regiões endêmicas para o pênfigo no Brasil. Dentre os principais, destacam-se os da família dos simulídeos (CULTON et al., 2008). Em um estudo epidemiológico, verificou-se que picadas destes insetos são quase 5 vezes mais frequentes em indivíduos com PFE, em relação a indíviduos controle. Possivelmente, o simulídeo possui em sua saliva alguma molécula que quando em contato com o sangue do indivíduo, gera uma resposta de anticorpos contra o domínio extracelular 5 (EC5) de Dsg1 (LOMBARDI et al., 1992; PEREIRA et al., 2004). Em um outro estudo, foi isolado o sialotranscriptoma da fêmea adulta de *Simulium nigrimanum*, e verificou-se a presença de mais de 30 famílias de proteínas passíveis de reação com o soro de pacientes de PFE (AOKI et al., 2011). Quian e colaboradores, em estudos com o flebotomíneo *L. longipalpis*, descobriram que as proteínas SGLL, presentes em suas glândulas salivares, eram antigênicas para anticorpos IgG4 e IgE do soro de pacientes com PF. Dentre os diversos componentes antigênicos de SGLL, LJM11 foi o mais reconhecido pelos autoanticorpos anti-Dsg1. Estes achados demonstram

que agentes ambientais podem ter um papel fundamental no desencadeamento de doenças autoimunes, através de mimetismo molecular (QIAN et al., 2012).

Outros autores propõem, porém sem comprovação a respeito, que infecções virais podem estar associadas à indução e/ou exacerbação do pênfigo (SAGI et al., 2008). Há ainda, hipóteses relacionadas a fatores nutricionais e ingestão de substâncias tóxicas presentes na água, porém não há dados experimentais que confirmem tais hipóteses (HANS-FILHO et al., 1999).

Ainda não está claro quanto tempo de exposição é necessário para o desenvolvimento do PFE, mas sabe-se que indivíduos de áreas não endêmicas que se mudam para áreas endêmicas, podem desenvolver a doença em um período de 6 a 12 meses após a chegada. Quando o paciente se muda para uma área não endêmica, a doença é facilmente controlada. Uma pequena parcela dos indivíduos com PFE nas áreas endêmicas apresenta a remissão da doença antes do tratamento. (DIAZ et al., 1989 [2]).

2.1.4.2 Fatores Genéticos e Imunogenéticos

Muitos casos de PFE ocorrem em indivíduos com mais de um membro da família acometido, sendo 93% destes geneticamente relacionados (pai e filho, por exemplo) e 7% não geneticamente relacionados (marido e esposa, por exemplo). Tal fato indica que além dos fatores ambientais, também existe uma predisposição genética para o desenvolvimento da doença (HANS-FILHO et al., 1999).

Os fatores genéticos atualmente associados ao desenvolvimento do PFE incluem alelos da família dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) de classe II, envolvidos na modulação da resistência a doenças autoimunes.

Destacam-se os alelos HLA-DRB1, em especial *DRB1-*0404, 1402, 1406, 1403, 1401 e 0102*, entre outros, cujas regiões hipervariáveis compartilham da mesma sequência LLEQRRAA, um epítopo que confere susceptibilidade ao PFE. Também estão positivamente associados os alelos HLA-DR14, HLA-DR4, HLA-DR1 e HLA-DQ1 (AOKI et al., 2011; SAGI et al., 2008; MEYERA e MISERY, 2010; BYSTRYN e RUDOLPH, 2005; PAVONI et al., 2003; PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989), enquanto os alelos HLA-DR7, HLA-DQ2 e HLA-DR3 estão associados com a proteção ao PF (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989).

Propõe-se que quando um indivíduo geneticamente susceptível entra em contato com o agente desencadeador da resposta imune, há um aumento da produção de interferon gama, que induz a expressão de HLA classe II nas membranas dos queratinócitos, ativando a produção de autoanticorpos pela exposição de peptídeos de Dsg1; e de interleucinas, que estimulam a resposta Th2, potencializando a resposta dos anticorpos (SAGI et al., 2008).

Umas das principais interleucinas envolvidas no PF é a IL-6. Quando em maiores concentrações no plasma, induz a produção de autoanticorpos, por meio do processamento e apresentação dos peptídeos pelas células apresentadoras de antígenos, para as células T autoreativas contra desmogleína. Polimorfismos no gene *IL6* já foram associados com proteção contra a doença (MEYERA e MISERY, 2010; PEREIRA et al., 2004).

Em outros estudos com polimorfismos, também foram associados ao PF os genes *IL4* (PEREIRA et al., 2004), *PDCD1* (BRAUN-PRADO e PETZL-ERLER, 2007), *LAIR1* e *LAIR2* (CAMARGO et al., 2016), genes *KIR*, como o ativador *KIR3DS1*, e também HLA-Bw4 de classe I (AUGUSTO et al., 2012).

Foram também demonstrados por Malheiros e colaboradores (2014), diversos genes diferencialmente expressos em pacientes de pênfigo, como o *CD1D*, envolvido na apresentação de antígenos lipídicos, cuja expressão mostrou-se aumentada em linfócitos de pacientes com PF generalizado, em

comparação com indivíduos controle e pacientes com lesões localizadas. Este mesmo gene apresentou também, uma expressão significativamente aumentada em biópsias de lesões, em comparação com tecidos não lesionados destes pacientes. Destacam-se também como diferencialmente expressos, alguns genes envolvidos na adesão e migração de linfócitos, como o *CD33*; na proliferação celular e na estimulação de linfócitos, como o *TNFSF13B* (*BLYS*); e na sinalização das MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), alterando principalmente a via da p38 MAPK, que tem mostrado um possível envolvimento na geração da autoreatividade. A atividade da p38 MAPK tem sido relacionada com a perda de adesão entre os queratinócitos e parece ser prolongada por células T e NK, presentes em lesões de PV. De fato, muitos genes diferencialmente expressos em PV, estão envolvidos na sinalização desta via (MALHEIROS et al., 2014).

Polimorfismos em *CD40*, *CD40L* e *BLYS* foram associados com a proteção à doença de forma sinérgica, onde os efeitos protetores dos genótipos associados de *CD40* e *CD40L* eram efetivos na presença do genótipo protetor de *BLYS*, e vice-versa, demonstrando a interação entre estes genes na modulação da patogênese da doença (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009).

Atualmente, devido ao envolvimento do sistema complemento nos mecanismos patológicos de PF, o Laboratório de Genética Molecular Humana (Universidade Federal do Paraná) tem investigado nesta doença o papel de genes envolvidos na cascata e na regulação do complemento. Em um estudo recente de Oliveira e colaboradores (2015), polimorfismos presentes em *CR1*, um importante regulador das etapas iniciais do complemento, foram associados com a proteção (rs3737002: OR=0,55, P=0,006; rs3849266: OR=0.66, P=0.046) e susceptibilidade ao PF (rs17047660: OR = 2,99, P = 0,033). Além disso, possivelmente devido ao seu papel anti-inflamatório, o aumento dos níveis séricos de sCR1 foi associado com a distribuição localizada das lesões, em comparação com lesões generalizadas, e também com o tratamento com corticoides (OLIVEIRA et al., 2015).

2.1.4.3 Fatores Imunológicos

No PFE, os autoanticorpos que reconhecem a Dsg1, induzem a ativação do sistema complemento e de proteinases, principalmente o plasminogênio ativado. Este se transforma em plasmina e lisa as substâncias intercelulares, rompendo as pontes entre as desmogleínas. Dessa forma, os demossomos assumem um aspecto arredondado e perdem a sua adesão, formando fendas intercelulares, fenômeno conhecido como acantólise (NISIHARA et al., 2003; AMORMINO e BARBOSA, 2010; OLIVEIRA-JR, 2012). Sugere-se que a acantólise ocorra também por mecanismos apoptóticos, visto que foi observada a associação dos autoanticorpos com proteínas pró-apoptoticas, assim como a presença exacerbada destas proteínas antes da acantólise (FRUSIC-ZLOTKIN et al., 2005; PUVIANI et al., 2003).

A Dsg1 possui 5 domínios extracelulares de ligação, de EC1 até EC5 (FIGURA 7). Pacientes de PFE com a doença inativa ou em remissão, assim como indivíduos saudáveis de áreas endêmicas, possuem anticorpos exclusivos para EC5, ao passo que, pacientes com o PFE ativo possuem principalmente anticorpos contra EC1 e EC2. Em concordância, pacientes com a doença reativada, voltam a reagir contra EC1 e EC2. Logo, o fenótipo do PF varia de acordo com o epítopo específico reconhecido pelos autoanticorpos (AOKI et al., 2004; AOKI et al., 2005; AOKI et al., 2011).

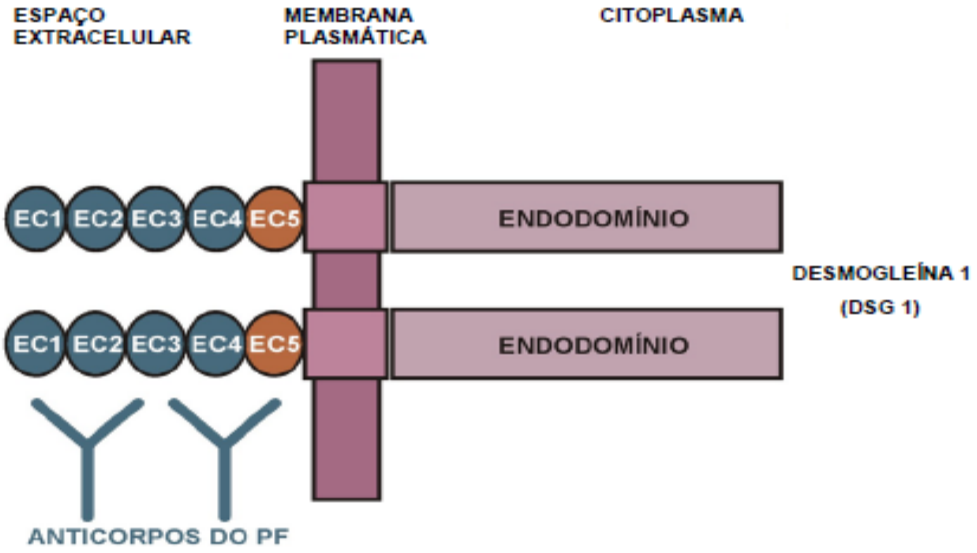


FIGURA 7. Estrutura da Dsg1 e domínios reconhecidos pelos autoanticorpos do pênfigo foliáceo. LEGENDA: Desmogleína 1 (Dsg1) com seu domínio citoplasmático (endodomínio) e seus 5 domínios extracelulares de ligação (EC1, EC2, EC3, EC4 e EC5). EC5 é reconhecido na fase pré-clínica pelos autoanticorpos do pênfigo foliáceo, enquanto que EC1 e EC2 são reconhecidos na fase clínica. FONTE: AOKI et al. (2004).

As lesões epidermais possuem um elevado infiltrado inflamatório, com predominância de células T $CD4^+$, inclusive específicas para Dsg1 (CAPRONI et al., 2001). Estas células T $CD4^+$ são necessárias para a ativação dos linfócitos B, que produzirão anticorpos específicos para Dsg1. Possuem resposta do tipo Th2, que leva a uma maior produção de anticorpos IgG4, em relação a IgG1 (MALHEIROS, 2009; PEREIRA et al., 2004; CULTON et al., 2008; LIN et al., 2000). De fato, os autoanticorpos contra a Dsg1 são do tipo IgG, cuja subclasse IgG1 é encontrada em altos níveis no soro de indivíduos saudáveis e com PFE, com ou sem a doença ativa, nas áreas onde há endemia. Este fato demonstra que o IgG1 não é por si só suficiente para desencadear a doença, sendo portanto, não patogênico. Já a subclasse IgG4 é encontrada quase que exclusivamente em indivíduos com a doença ativa, demonstrando haver uma importância dessa imunoglobulina na patogênese do PFE. Dessa forma, o elemento desencadeador do PF parece estimular a produção de IgG1, porém a doença só se manifesta em indivíduos que

possuam uma susceptibilidade (modulada principalmente pelas moléculas de HLA) que permita a produção de IgG4, levando à resposta autoimune patogênica (BYSTRYN e RUDOLPH, 2005; CULTON et al., 2008).

Os anticorpos IgM dirigidos contra a Dsg1 parecem não ter relevância funcional em indivíduos com PFE ou com outras doenças bolhosas, e tampouco em indivíduos saudáveis de regiões urbanas. Contudo, estão presentes no soro de muitos indivíduos saudáveis residentes em áreas endêmicas, apoiando a hipótese da sensibilização por um vetor (CULTON et al., 2008), e seus níveis tendem a diminuir quando o indivíduo, previamente sensibilizado, migra para regiões urbanas (AOKI et al., 2011). Além de autoanticorpos IgG4 e IgM, pacientes de PFE também possuem níveis elevados de IgE. O mecanismo envolvido no aumento dos níveis destes autoanticorpos são ainda desconhecidos (QIAN et al., 2012).

Sabe-se que a ligação patogênica antígeno-anticorpo ativa a cascata do sistema complemento, sendo este outro importante mecanismo imunológico envolvido na fisiopatologia do pênfigo. A ativação exacerbada dessa cascata imune leva à deposição de seus componentes líticos nos espaços intercelulares do epitélio, sendo observada nas lesões destes pacientes e associada com o processo de acantólise (JORDON et al., 1980; KAWANA et al. 1985, 1989, 1990; MESSIAS-REASON et al. 1988, 2008, 2011)

2.2 SISTEMA COMPLEMENTO

2.2.1 A Cascata do Sistema Complemento

O sistema complemento (SC) é um importante mecanismo da imunidade inata e específica na defesa do organismo contra patógenos, constituído por um conjunto de mais de 45 proteínas, tanto solúveis no plasma, como

expressas na membrana das células (RICKLIN et al., 2010). O SC pode ser ativado por 3 vias: via clássica, alternativa ou das lectinas. Na via clássica, domínios das imunoglobulinas IgG1, IgG3 e IgG2 interagem com C1q, um hexâmero ao qual estão ligadas as proteases C1r e C1s. Isto leva à ativação enzimática de C1r e C1s, onde C1s cliva as moléculas subsequentes da cascata, C4 e C2, em C4a e C4b e C2a e C2b respectivamente. C4b liga-se à parede de patógenos ou à membrana celular. Em seguida, sua ligação com C2b, forma uma nova enzima, a C3 convertase (C4b2b), que cliva a molécula C3 (C3a e C3b). Na via das lectinas, a ativação ocorre pela lectina ligante de manose (MBL), ficolinas e colectina 11, que reconhecem determinados açúcares e resíduos acetilados na membrana de patógenos e células alteradas. Analogamente a C1q com C1r e C1s, estas proteínas estão associadas às proteases MASP1 e MASP2, que clivam C4 e C2, e dão continuidade à cascata. A via alternativa é iniciada pela hidrólise espontânea de C3 (BOLDT et al., 2012; PETERSEN et al., 2011; ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001).

As três vias do SC culminam da formação de C3 convertase. Esta enzima converte C5 na fração C5b, que por sua vez, se liga aos componentes C6-C9, formando o complexo de ataque à membrana (MAC), ou ainda, complexo lítico terminal (TLC), pela polimerização do C9. O MAC se deposita nos tecidos e lisa as células através da formação de poros na bicamada fosfolipídica (FIGURA 8). Estes interferem na permeabilidade seletiva da membrana, através da saída de pequenas moléculas citoplasmáticas e entrada inadequada de íons e água, lisando a célula por ruptura osmótica. Em outras células, causa a lise por um mecanismo similar à ação da perforina. Os produtos de degradação de C3, C4 e C5 promovem contração da musculatura lisa e desgranulação de basófilos e mastócitos, com a liberação de histamina e outras substâncias vasoativas; ativação de macrófagos e liberação de enzimas lisossomais e radicais de oxigênio; agregação e fagocitose de complexos imunes (PETERSEN et al., 2011; UTIYAMA et al., 2004; ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001; MULLER-EBERHARD, 1988).

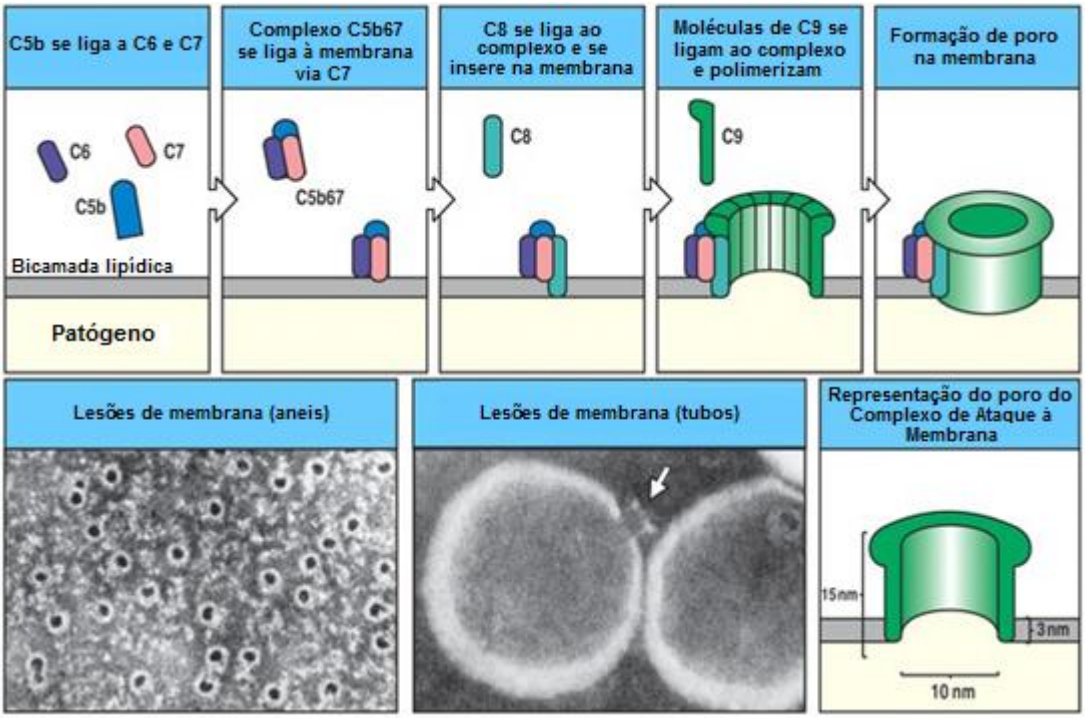


FIGURA 8. Formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) nas células alvo.
FONTE: Adaptado de Immunobiology, 6ª ed., fig 2-35 (Garland Science, 2005).

2.2.2 Desregulação do Complemento e Doenças

Apesar de seu fundamental papel na defesa do organismo contra patógenos, o SC deve ser muito bem controlado por suas proteínas reguladoras, pois caso seja ativado de forma exacerbada ou inapropriadamente, pode levar à deposição de seus componentes líticos no soro e nos tecidos, e consequente injúria aos mesmos. Os efeitos lesivos ocasionados pelo comprometimento da regulação do SC são observados em diversas condições patológicas, como doenças crônicas autoimunes (BOLDT et al., 2012; KAWANA et al., 1989; ACOSTA et al., 2000; MESSIAS-REASON et al., 2011; PETERSEN et al., 2011; UTIYAMA et al., 2004; ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO et al., 2001).

Dentre as diversas doenças autoimunes que envolvem a participação do SC, destacam-se: lupus eritematoso sistêmico, anemia hemolítica, pênfigo,

artrite reumatoide, miocardite, esclerose múltipla, diabetes, e polineuropatias, além de alguns tipos de injúrias renais, intestinais e outras complicações (HOCHSMANN et al., 2014; YANG et al., 2000; DELGADO et al., 2009; ALEGRETTI et al., 2009; ACOSTA et al., 2000; KRUS et al., 2014; HOLERS, 2008).

A desregulação do sistema complemento também pode ser prejudicial por destruir os exossomos. Os exossomos são vesículas formadas a partir dos endossomos, de 40 a 90 nm de diâmetro e que se fundem à membrana plasmática, transportando moléculas HLA classe II para a superfície da célula junto com seus peptídeos antigênicos. São liberados no espaço extracelular, onde os exossomos derivados das células apresentadoras de antígeno (APCs) estimulam a resposta antígeno-específica de células T CD4+ e CD8+, e os derivados de outras células estão relacionados com a tolerância imunológica. A regulação imunológica pelos exossomos, provavelmente ocorre por reação cruzada entre as respostas de células T e células dendríticas. Contudo, as estruturas vesiculares, ao passarem para o meio extracelular, são propensas a ativar o sistema complemento, graças às suas membranas lipídicas que interagem eletrostaticamente com outras moléculas, e por serem derivados de compartimentos celulares processadores de antígenos, o que geralmente os tornam associados a peptídeos antigênicos. Logo, podem se ligar a imunoglobulinas, ativando o sistema complemento (CLAYTON et al., 2003). Além disso, o descontrole do sistema complemento também interfere na produção e na secreção exossomal de insulina pelas células beta de Langerhans, o que também demonstra sua participação em complicações da diabetes tipo 2 (KRUS et al., 2014).

2.2.2.1 O Complemento e o Pênfigo

Embora a etiologia do PF seja complexa e pouco conhecida, sabe-se que é caracterizada por autoanticorpos que reconhecem a Dsg1 e que também

ativam o sistema complemento. Em 1980, Jordan e colaboradores demonstraram por imunofluorescência mediada pelo soro de pacientes penfigoides, a deposição de alguns componentes do SC, como C3, C4 e C1q, nos espaços intercelulares da epiderme (JORDON et al., 1980). A sua deposição causa o rompimento da adesão entre células da epiderme e mucosa (acantólise) e lesões bolhosas (KAWANA et al. 1985, 1988; MESSIAS et al. 1988), inclusive pela formação do MAC (XIA et al. 1988; KAWANA et al. 1989, 1990; LAPIERE et al. 1998; WALPORT, 2001). Neste sentido, Kawana e colaboradores (1985) demonstraram que na ausência do SC, os anticorpos IgG patogênicos de PF e PV levavam a uma separação muito fraca das células, ao passo que, na presença do SC e do IgG patogênico, havia um aumento significativamente maior da acantólise. Foi observado ainda, que a inativação térmica do SC, ou inativação do C1q, era capaz de inibir totalmente a acantólise (KAWANA et al. 1985). Em estudos posteriores, também foi encontrada a presença de componentes tardios do SC nos espaços intercelulares, como C5, C7, C9 e C5b-9 (MAC) (KAWANA et al., 1989).

Messias-Reason e colaboradores (2011) investigaram biópsias de pênfigo vulgar e verificaram a deposição de IgG e C3 nos espaços intercelulares de lesões epidermais, C5b-9 nos espaços intercelulares de todos os espécimes e MBL nos espaços intercelulares e membrana basal de todos os espécimes. Em 50% das biópsias, houve deposição de Ficolina-2 na membrana basal, especialmente na biópsia de um paciente com PV intensamente ativo. De acordo com estes dados, sugere-se que no PV, o SC pode ser ativado pela via das lectinas, com formação do MAC. Em um outro trabalho da mesma autora (2008), MBL e MASP-2 tiveram seus níveis quantificados no soro de pacientes de PFE, sendo que os níveis de MBL se apresentavam ligeiramente mais altos que em indivíduos controle. Visto que os autoanticorpos de pênfigo ativam o sistema complemento, e a co-localização de C3 e C5b-9 está geralmente presente nas lesões desta patologia, sugere-se que o SC participa ativamente nas diferentes formas de pênfigo, podendo também ser ativado por MBL e Ficolina-2 (MESSIAS-REASON et al., 2011; MESSIAS-REASON et al., 2008).

No soro de pacientes de PFE, também foram observados níveis elevados dos componentes C4d/C4 e fator Ba, das vias clássica e alternativa, respectivamente. Estes fragmentos do SC não são detectados em indivíduos saudáveis, ao passo que, estão presentes em níveis significativos em pacientes de PFE (MESSIAS-REASON et al., 1988).

Logo, a deposição de componentes do complemento nos tecidos de pacientes de PFE, bem como o envolvimento do SC no processo de acantólise (KAWANA et al., 1989), deixa claro que este sistema desempenha um papel fundamental na patogênese da doença.

2.2.3 Reguladores do Sistema Complemento

A fim de equilibrar a atividade do SC e proteger os tecidos próprios, existem diversas proteínas reguladoras que atuam em diferentes etapas da cascata, controlando este sistema e inibindo suas possíveis ações líticas (FIGURA 9).

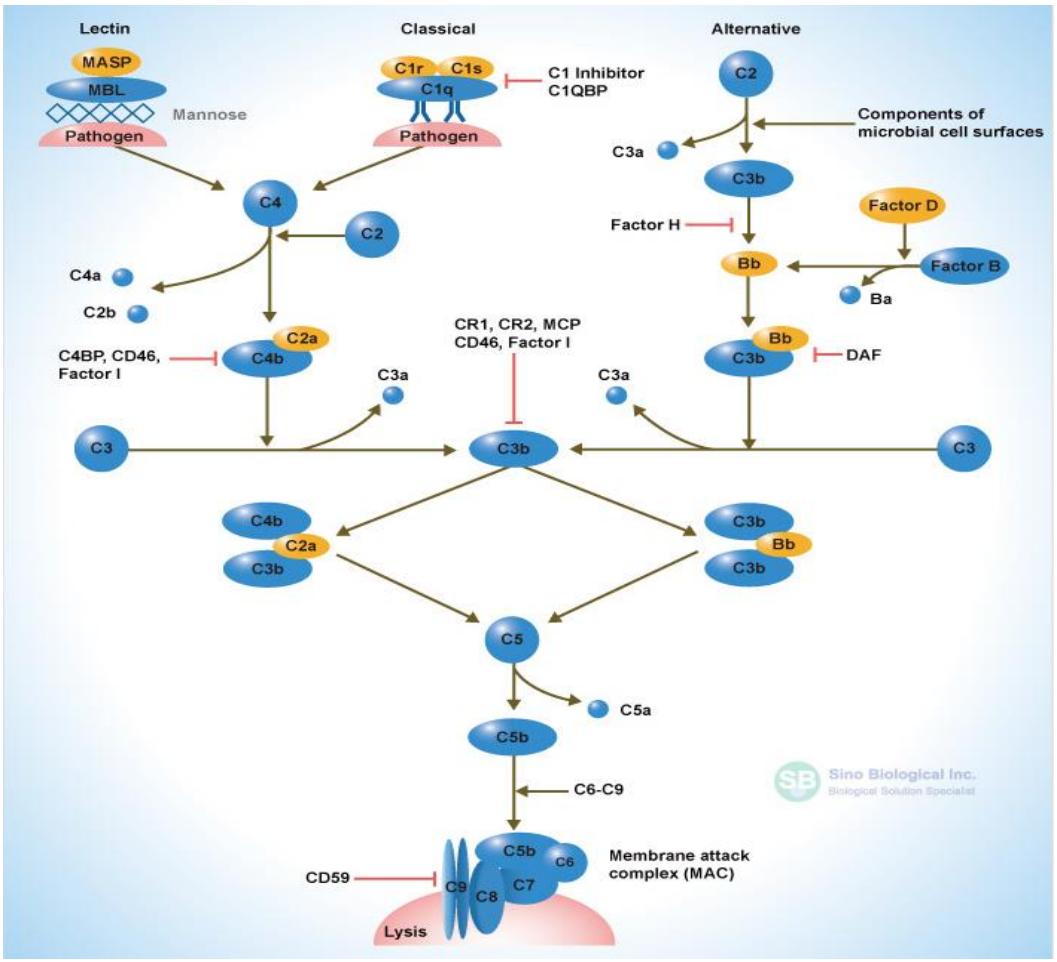


FIGURA 9. Etapas da cascata do Sistema Complemento e de seus reguladores. FONTE: Sino Biological Inc. Disponível em: <(http://www.sinobiological.com/Complement-Activation-Pathways_image_pcomplement-activation-pathways.html)>. Acesso em 23/09/2015.

Dentre as proteínas reguladoras do SC, se destacam CD55 e CD59, que são glicoproteínas globulares ancoradas à membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (LAW; REID, 1988; KIMBERLEY et al., 2007; ALEGRETTI et al., 2009; CLAYTON et al., 2003).

A CD55, também conhecida como fator acelerador de degradação (DAF), inibe a formação de C3 e C5, prevenindo a clivagem de C3, e acelera a degradação das enzimas C3 e C5 convertases pré-formadas (Figura 10-A). Além de regular o SC, também parece proteger as células contra a lise mediada pelas células NK. Já a proteína CD59, também conhecida como

Protectina, ou ainda Inibidor da lise de membrana (MIRL), impede a ligação de C9 com C5b-8, inibindo assim a formação do MAC (Figura 10-B) (NORIS; REMUZZI, 2013; ALEGRETTI et al., 2009).

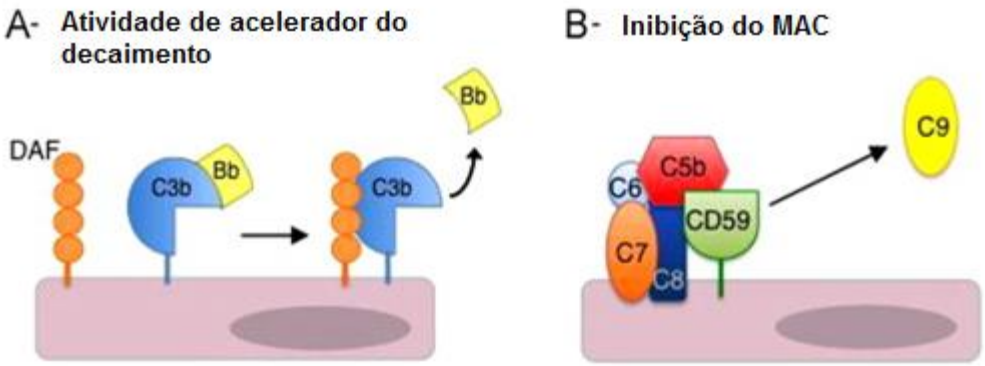


FIGURA 10. Mecanismos de regulação do SC por: (A) dissociação e desestabilização de convertases pela CD55 (DAF); (B) inibição da formação do MAC pela CD59.
FONTE: Adaptado de NORIS e REMUZZI (2013).

2.3 PROTEÍNA CD59

2.3.1 Estrutura e Função

Codificada pelo gene *CD59,* e também conhecida como Inibidor da Lise Reativa de Membrana (MIRL) ou Protectina, a CD59 (*Cluster Differentiation* 59) é uma proteína globular pequena, de 128 aminoácidos e aproximadamente 20 kDa, que se ancora à membrana das células através de seu domínio glicosilfosfatidilinositol (GPI). CD59 é um potente regulador da etapa final do SC, impedindo a ligação de C5b-8 com C9, e consequente formação do MAC na membrana celular, protegendo assim, as células homólogas dos efeitos lesivos dessa cascata (FIGURA 11) (KIMBERLEY et al., 2007; ALEGRETTI et al., 2009).

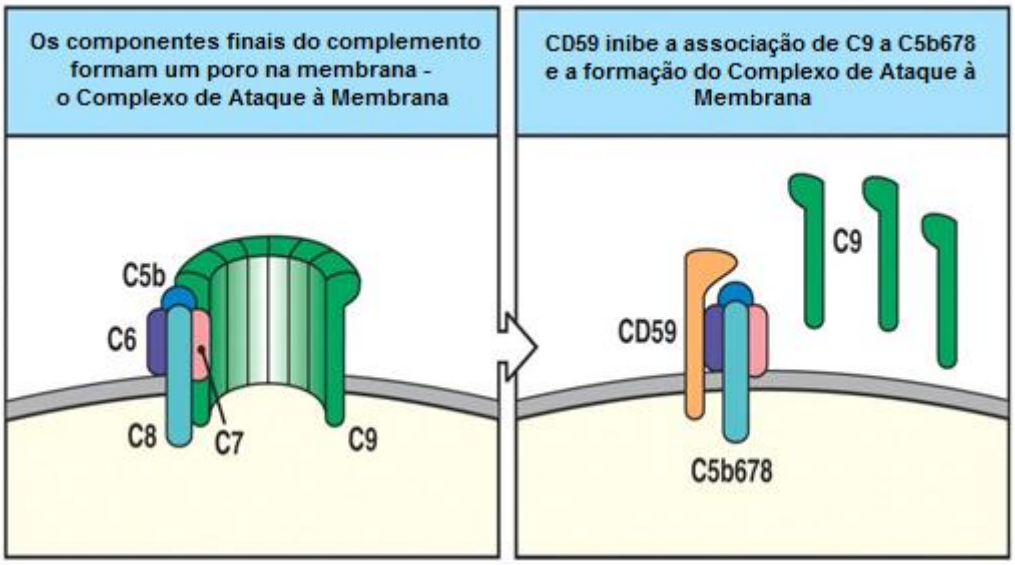


FIGURA 11. A inibição estrutural do MAC pela ligação do CD59 ao C5b-8.

FONTE: Adaptado de Immunobiology, 6ª ed., fig 2-35 (Garland Science, 2005).

A proteína CD59 possui em sua sequência resíduos de cisteína que formam cinco pontes dissulfeto, levando à formação das voltas encontradas em sua forma secundária (FIGURA 12), bastante similares às da superfamília de proteínas Ly6. Por entre essas voltas, encontram-se os domínios de ligação a C8 e C9 (HUANG et al., 2006; HUANG et al., 2007).

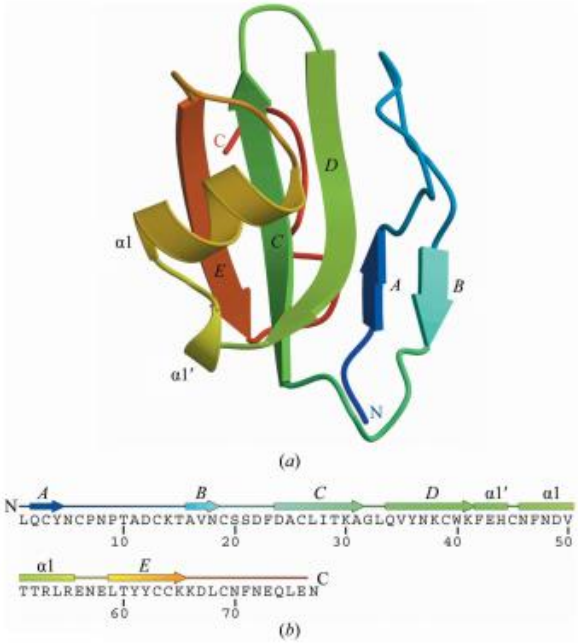


FIGURA 12. Estrutura tridimensional da forma secundária da proteína CD59 humana. As cores variam do azul ao vermelho na direção N-terminal a C-terminal, de acordo com a sequência dos aminoácidos. FONTE: Huang et al., 2007.

A eficiência da CD59 na proteção dos tecidos contra as ações líticas do sistema complemento motivou a produção de formas recombinantes desta proteína, com diversas aplicações terapêuticas (KIMBERLEY et al., 2007).

A aplicação da CD59 na terapia, assim como de outras proteínas reguladoras do SC, possui justamente o objetivo de diminuir a formação de produtos líticos do SC nas doenças autoimunes, podendo ser utilizada em associação com anticorpos, com caudas lipídicas, e também na terapia gênica. Estão sendo elaboradas pró-drogas com reguladores do SC, que são inativas na circulação e ativas nos locais de ação das doenças autoimunes. Pelo fato da CD59 inibir a formação do MAC, esta proteína é estrategicamente utilizada na terapia de segunda geração, onde é associada a locais de ação patológicos e a membranas, o que aumenta sua eficiência e seu tempo de meia-vida na

circulação. A utilização da CD59 associada a determinados fragmentos de anticorpos específicos, forma um complexo CD59-Ig que se liga às células que expressam o antígeno alvo, protegendo-as da ação do SC ou servindo como um biomarcador para os locais de inflamação (HARRIS et al., 2002).

Alguns tratamentos também possuem como mecanismo de ação a indução de CD59, como forma de amenizar a ação do SC. Um exemplo é o uso da estatina na artrite reumatoide, que protege o endotélio vascular da injúria causada pela deposição dos componentes do SC, através do aumento da expressão de CD59 em tecidos com hipóxia (KINDERLERER et al., 2006). No entanto, além da clássica e bem estabelecida função de regulação do SC, CD59 também parece participar na indução da morte celular, sinalização de células T e produção de citocinas (MONLEÓN et al., 2000; KIMBERLEY et al., 2007).

Células T e B são comumente reguladas por apoptose, o que evita os processos de autorreatividade. Em células T, a ligação da CD59 com anticorpos anti-CD59 leva à liberação do fator apoptótico APO2L/TRAIL, induzindo a morte celular *in vitro* (MONLEÓN et al., 2000). Em murinos, esta atividade parece depender de um ligante de APCs. Sua importância é evidente em camundongos *knock-out* para CD59a, que apresentaram uma proliferação aumentada de células T CD4+ ativadas, porém não CD8+, e uma resposta antiviral mais eficiente (LONGHI et al., 2005).

Já em humanos, CD59 transduz sinais acessórios para proliferação de células T e estimula a síntese de IL-2 e inositol fosfato *in vitro* (KORTY et al., 1991); participa da ativação, adesão e transdução de sinais em células T e neutrófilos, mediada por tirosina-quinase através da fosforilação da subunidade TCRζ/ZAP70 (DECKERT et al., 1992; VAN DEN BERG et al., 1995); aumenta a citotoxicidade de células NK dependendo do receptor primário NKp46, e medeia o efeito citotóxico em células alvo nas quais é expressa (OMIDVAR et al., 2006; MARCENARO et al., 2003). Também participa da regulação de

células B em murinos (KIMBERLEY et al., 2007). Contudo, os mecanismos de transdução de sinais de CD59, assim como de outras proteínas de ancoragem GPI, ainda não estão bem compreendidos.

Queratinócitos também expressam CD59. Estas células produzem interleucina 1-alfa (IL-1α), interleucina 6 (IL-6) e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), entre outras citocinas, após a ligação de CD59 a CD2, presente na membrana de células T e NK (NADERI et al., 1999). CD59 também atua como um receptor de lipopolissacarídeos (LPS) nos queratinócitos do epitélio oral. A ligação CD59-LPS leva à translocação de NF-κB para o núcleo, estimulando a produção do fator de necrose tumoral-alfa (TNFα), IL-6 e GM-CSF. Estes mecanismos podem estar envolvidos na patologia de doenças inflamatórias de pele e mucosas (YAMAMOTO et al., 2003).

2.3.2 CD59 e exossomos

Como já falado anteriormente, as vesículas exossomais das APCs possuem um importante papel na resposta imunológica. Por este motivo, quando expelidas das células devem se manter resistentes ao ataque do SC, a fim de que possam cumprir com sua função. Clayton e colaboradores verificaram que a CD59 é bastante expressa nos exossomos e nas superfícies celulares das APCs, defendendo-os do SC, impedindo sua lise. Bloqueando-se a CD59, notou-se que houve uma lise exacerbada mediada pelo SC. Portanto, a proteína CD59 está envolvida na resistência à lise mediada pelo SC, sendo de extrema importância para a sobrevivência extracelular e desempenho correto das funções do exossomos no sistema imunológico (CLAYTON et al., 2003).

A CD59 também está envolvida na função exocitótica de insulina pelas células beta pancreáticas. Em experimentos feitos com ilhotas pancreáticas

humanas e de roedores, constatou-se que nas células beta produtoras de insulina havia uma alta expressão de CD59, que era significativamente reduzida em ratos pré-diabéticos. Krus e colaboradores sugerem que além da sua função bem conhecida de regular a formação do MAC impedindo a injúria tecidual por parte do complemento, a proteína CD59 desempenha um papel importante na estabilização dos *rafts* lipídicos, em diferentes tipos de células. Nas células beta, isto teria influência na taxa de secreção basal de insulina (KRUS et al., 2014).

Outro estudo relacionado à diabetes verificou que a CD59 pode ser inativada por glicação, o que pode causar o aumento da deposição da MAC e uma proliferação celular resultante, por estimulação de fatores de crescimento induzidos pela MAC nas células endoteliais. Porém, isso ocorre apenas com a CD59 humana, visto que esta possui um motivo onde ocorre a glicação, que não está presente na CD59 de outras espécies. Isso parece explicar a propensão humana de desenvolver complicações proliferativas da diabetes (ACOSTA et al., 2000).

2.3.3 CD59 e doenças

Devido ao efeito protetor dos reguladores do complemento, alguns vírus envelopados se integram a estas proteínas para conseguirem se instalar nas células hospedeiras. Este mecanismo de escape dos efeitos líticos do complemento, é utilizado pelo vírus da Herpes 1 (HSV-1), vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), Ebola vírus, Cytomegalovirus (CMV), Influenza, entre outros vírus envelopados (SPEAR et al., 1995; HU et al., 2010; AMET et al., 2012). Essa estratégia também foi demonstrada em vírus da Hepatite C (HCV), que se encontram integrados a moléculas de CD59 em alguns tipos celulares e no plasma de pacientes infectados por HCV, o que

torna estes vírus protegidos da ação do SC (AMET et al., 2012). Estes achados demonstram que a inibição de CD59 e de outros reguladores do SC são importantes mecanismos de instalação de algumas doenças virais.

Em diversos tipos de câncer, as células malignas utilizam de um mecanismo parecido. Tecidos tumorais possuem uma maior expressão de CD59, em comparação com tecidos saudáveis adjacentes, o que permite a resistência destes tecidos ao ataque do SC e das células metastáticas ao entrarem na circulação (GORTER e MERI, 1999). O aumento da expressão de CD59 como mecanismo de escape apresentado pelas células tumorais, parece estar associado a alterações na acetilação de p53, um importante supressor tumoral envolvido na regulação de diversas proteínas de proteção celular (DONEV et al., 2006).

Em doenças autoimunes, a deficiência de CD59 está aos poucos sendo caracterizada, sendo primeiramente descrita na hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) (ALEGRETTI et al., 2009).

HPN é uma anemia hemolítica crônica, caracterizada por infecções recorrentes, neutropenia e trombocitopenia, e surge em associação com outras doenças hematológicas, especialmente com síndromes de insuficiência medular, como anemia aplásica e síndromes mielodisplásicas. O nome desta doença é devido à destruição dos eritrócitos, com liberação de hemoglobina na urina, mostrando uma evidente coloração escura na primeira urina da manhã. Por este motivo, acreditava-se que a hemólise ocorria durante o sono. Atualmente já se sabe que a hemólise ocorre durante todo o dia, devido à mutações no gene *fosfatidilinositolglicana* em células tronco hematopoiéticas, que resultam no bloqueio da síntese de GPI. Desta forma, as proteínas de superfície ancoradas à GPI estão ausentes na membrana destas células, inclusive CD55 e CD59. Pela ausência destas proteínas, os eritrócitos destes indivíduos estão susceptíveis ao ataque do SC (PU e BRODSKY, 2011; ARRUDA et al., 2010).

Assim como na HPN e em outras anemias hemolíticas, a deficiência de CD59 também já está bem estabelecida em polineuropatias imunes, que muitas vezes acompanham as doenças citadas acima. Sugere-se que o consequente descontrole do SC ocasione danos na mielina e axônios destes indivíduos (NEVO et al., 2013; HOCHSMANN et al., 2014). Na doença de Alzheimer, o peptídeo beta amiloide parece mediar a ativação do SC, cujos componentes C9 e MAC encontram-se em níveis elevados no córtex frontal e hipocampo dos pacientes, em contraste com os níveis bastante reduzidos de CD59. Estes dados demonstram a provável relação entre a deficiência de CD59 nestes tecidos, com a vulnerabilidade neuronal característica na doença de Alzheimer (YANG et al., 2000).

Associações de CD59 também tem sido estudadas em diversas outras doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, artrite reumatoide, neuromielite ótica (KINDERLERER et al., 2006; RUIZ-ARGÜELLES et al., 2007; DELGADO et al., 2009; ALEGRETTI et al., 2009; HUANG et al., 2007; ACOSTA et al., 2000; KIMBERLEY 2007), além de rejeições em transplantes (BUDDING et al., 2016), e complicações proliferativas na diabetes, devido a fatores como glicação da CD59 e alteração exossomal na secreção de insulina, já anteriormente mencionados (ACOSTA et al., 2000; KRUS et al., 2014). Neste estudo, sugere-se uma possível associação da deficiência de CD59 também com a susceptibilidade ao PF.

2.4 GENE *CD59*

2.4.1 Estrutura e Expressão

O gene *CD59* está localizado na região cromossômica 11p13 (coordenadas - GRCh37: 11:33,724,555-33,758,024) (FIGURA 13), onde também estão inseridos os genes *FBXO3* (que codifica a proteína F-box) e *C11orf91* (Cromossomo 11 open reading frame 91) (ENSEMBL, 2016).

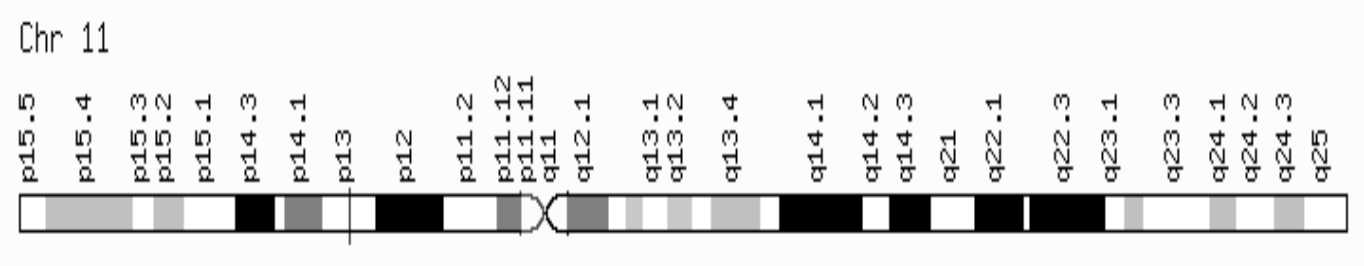


FIGURA 13: Localização do gene *CD59* no braço curto do cromossomo 11.
FONTE: Imagem retirada do banco de dados *Genecards* em 09/2015. Disponível em: <(http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD59&snp=705&search=cd59#snp)>.

CD59 possui 41 ortólogos, presentes em 68 espécies de animais, incluindo invertebrados. Foi descrita uma sequência similar à de *CD59* no genoma de vertebrados primitivos, assim como alguns componentes do SC no plasma dos mesmos. Estes fatos sugerem a presença do MAC, assim como de seu principal regulador, atuando já em vertebrados primitivos (DZICK, 2010; ENSEMBL, 2015).

O gene *CD59* possui ao todo 10 exons, que formam 14 diferentes transcritos por processamento (splicing) alternativo (TABELA 1 e FIGURA 14), dos quais 4 não são traduzidos e os outros 10 traduzem uma único polipeptídeo, de 128 aminoácidos (incluindo o peptídeo sinal) (ENSEMBL, 2016).

TABELA 1. Diferentes transcritos do gene CD59.

Nome	Transcrito	Comprimento do transcrito (pb)	Comprimento da proteína (aa)	Tipo
CD59-002	ENST00000395850	1889	128	Codificador de proteína
CD59-003	ENST00000415002	1878	128	Codificador de proteína

CD59-001	ENST00000351554	1775	128	Codificador de proteína
CD59-008	ENST00000445143	825	128	Codificador de proteína
CD59-009	ENST00000437761	758	128	Codificador de proteína
CD59-007	ENST00000426650	741	128	Codificador de proteína
CD59-005	ENST00000527577	686	128	Codificador de proteína
CD59-006	ENST00000528700	652	128	Codificador de proteína
CD59-010	ENST00000533403	1847	119	Codificador de proteína
CD59-012	ENST00000534312	572	130	Codificador de proteína
CD59-011	ENST00000525763	789	128	Sem sentido
CD59-013	ENST00000527926	633	108	Sem sentido
CD59-014	ENST00000533181	424	58	Sem sentido
CD59-004	ENST00000528987	3716	sem produto proteico	Com intron retido

LEGENDA: A maioria dos transcritos são codificados em proteínas, com exceção de CD59-004. CD59-011, CD59-013 e CD59-014 codificam proteínas não funcionais. Pb - pares de bases; aa – aminoácidos.
FONTE: Baseado em dados do ENSEMBL. Disponível em: <(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000085063;r=11:33698261-33736445)>. Acesso em 03/2016.

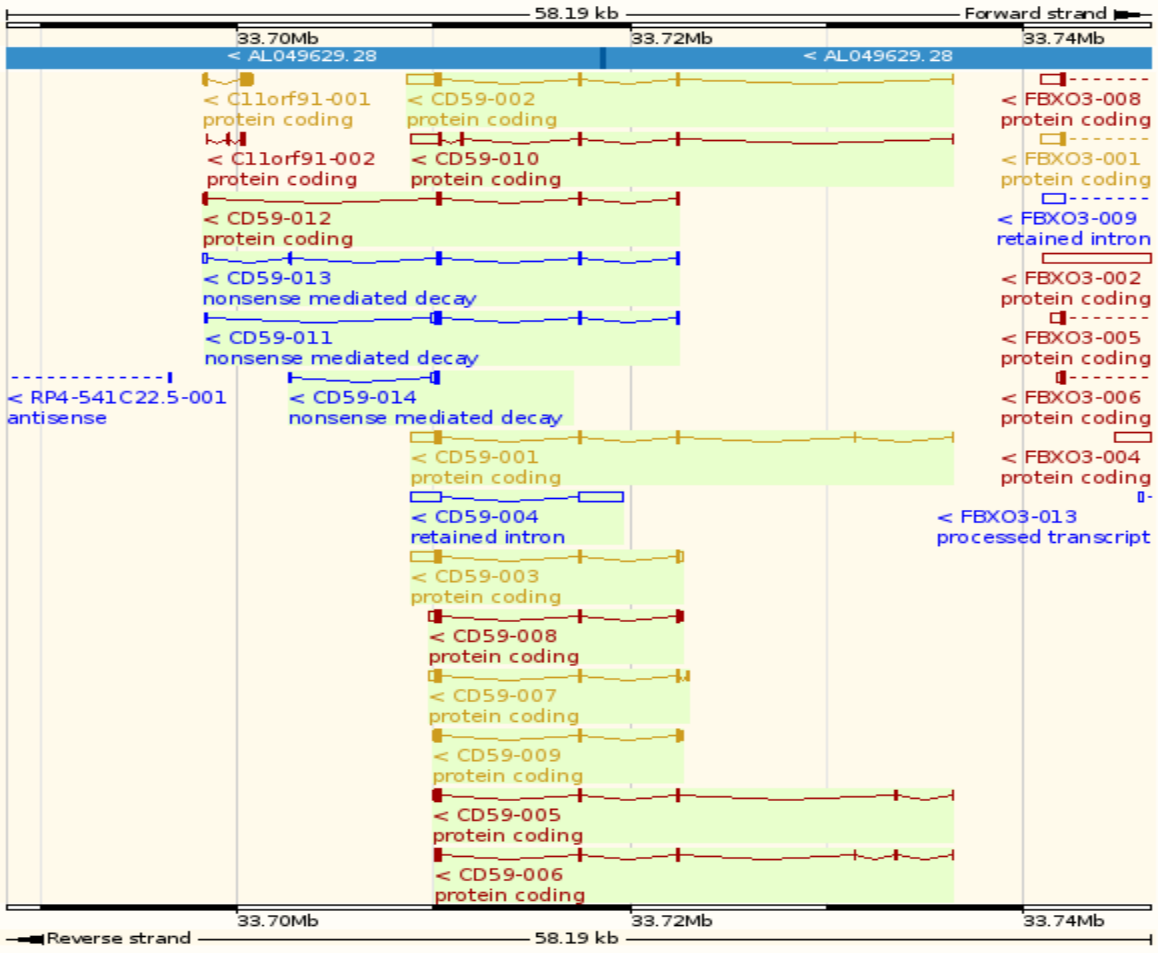


FIGURA 14. Transcritos de CD59 situados em regiões alternativas. LEGENDA: o gene *CD59* possui 14 mRNAs. As flechas indicam o sentido da transcrição. Os blocos preenchidos representam os exons, os blocos não-preenchidos representam regiões não traduzidas, e as linhas por entre os blocos representam os introns. Os transcritos em vermelho são condificados em proteína; os transcritos em laranja foram analisados pelos navegadores genômicos Ensembl e Havana; os transcritos em azul são transcritos processados. FONTE: ENSEMBL. Acesso em 03/2016. Disponível em: <(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000085063;r=11:33698261-33736445)>.

Devido à sua importância, CD59 é amplamente expressa nos tecidos e em todas as células sanguíneas (KIMBERLEY et al., 2007; ALEGRETTI et al., 2009), a partir do seu principal transcrito CD59-001 (ENST00000351554), encontrado em abundância nos diferentes tecidos, seguido de CD59-002

(ENST00000395850). Os demais transcritos não possuem expressão significativa, sendo encontrados em baixíssimas quantidades em tecidos específicos (FIGURA 15).

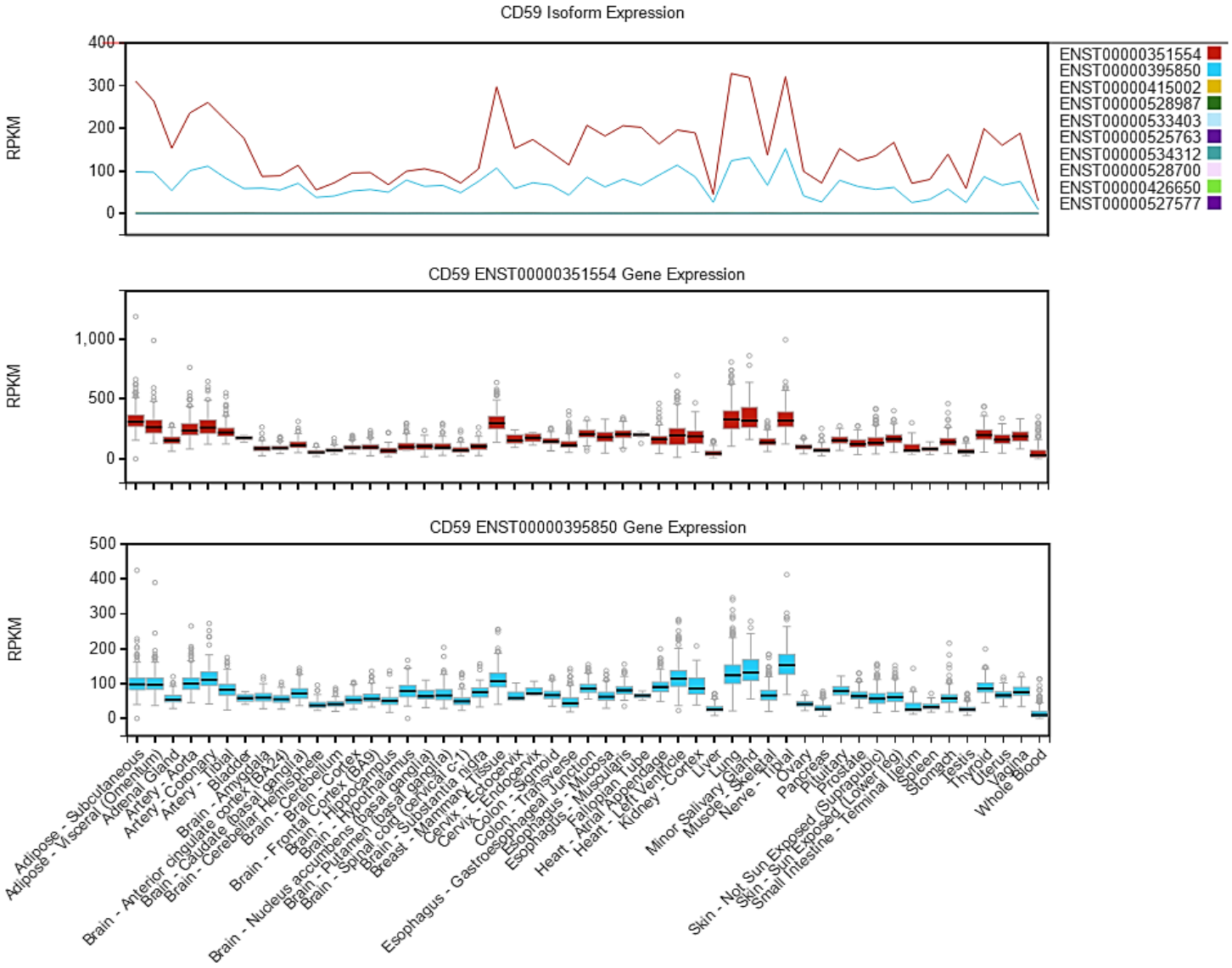


FIGURA 15. Níveis de expressão gênica de CD59 em diferentes tecidos.

LEGENDA: Os valores de expressão estão em RPKM (Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads). No quadro superior, valores relativos dos níveis teciduais de expressão dos diferentes transcritos de CD59, com destaque para ENST00000351554 (CD59-001, em vermelho) e ENST00000395850 (CD59-002, em azul), em escala linear. Os outros transcritos são expressos em

baixos níveis. No quadro inferior, os box plots representam a expressão gênica dos respectivos transcritos nos tecidos, com as medianas e percentis a 25% e 75%.
FONTE: GTEX Portal (disponível em <http://www.gtexportal.org/home/gene/CD59>). Acesso em 03/2016.

CD59-001 possui 5 exons (referentes aos exons 1, 3, 5 c/d, 6 e 8 do gene), dos quais o primeiro e o segundo não são traduzidos, o terceiro codifica a sequência líder hidrofóbica, o quarto codifica a porção N-terminal da proteína e o último exon codifica o restante da proteína madura. Outros transcritos podem apresentar mais ou menos exons por processamento alternativo, contudo, a preservação dos exons 5c/d, 6 e 8 é obrigatória para que o transcrito seja funcional, pois são estes os exons que de fato codificam a proteína. CD59-002 difere de CD59-001 pela ausência do exon 2 (FIGURAS 16 e 17) (PETRANKA et al., 1992; ENSEMBL, 2016; GTEX Portal, 2016). É possível que este exon alternativo apresente um papel importante na função da isoforma principal.

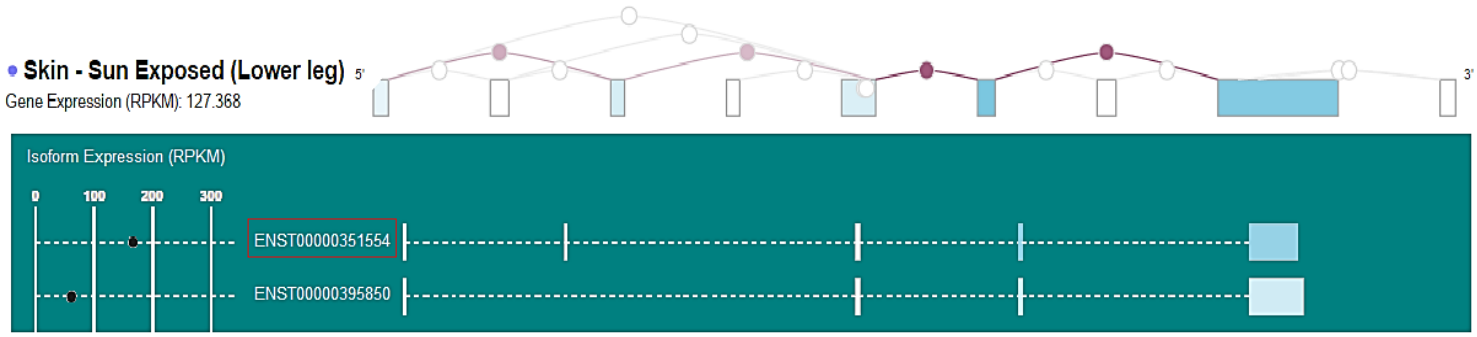


FIGURA 16. Processamento alternativo dos principais transcritos de *CD59* no tecido epitelial.
LEGENDA: Acima do retângulo verde está ilustrado o gene *CD59*. Os retângulos representam os exons e os círculos as possíveis regiões de processamento alternativo. Cores mais fortes representam maiores níveis de expressão, que neste exemplo são específicos na pele. Dentro da área verde então os principais transcritos de *CD59*, com seus respectivos exons e expressões epiteliais, em RPKM. Destacado em vermelho, a isoforma CD59-001 com 5 exons.
FONTE: Adaptado de GTEX Portal (disponível em <http://www.gtexportal.org/home/gene/CD59>). Acesso em 03/2016.

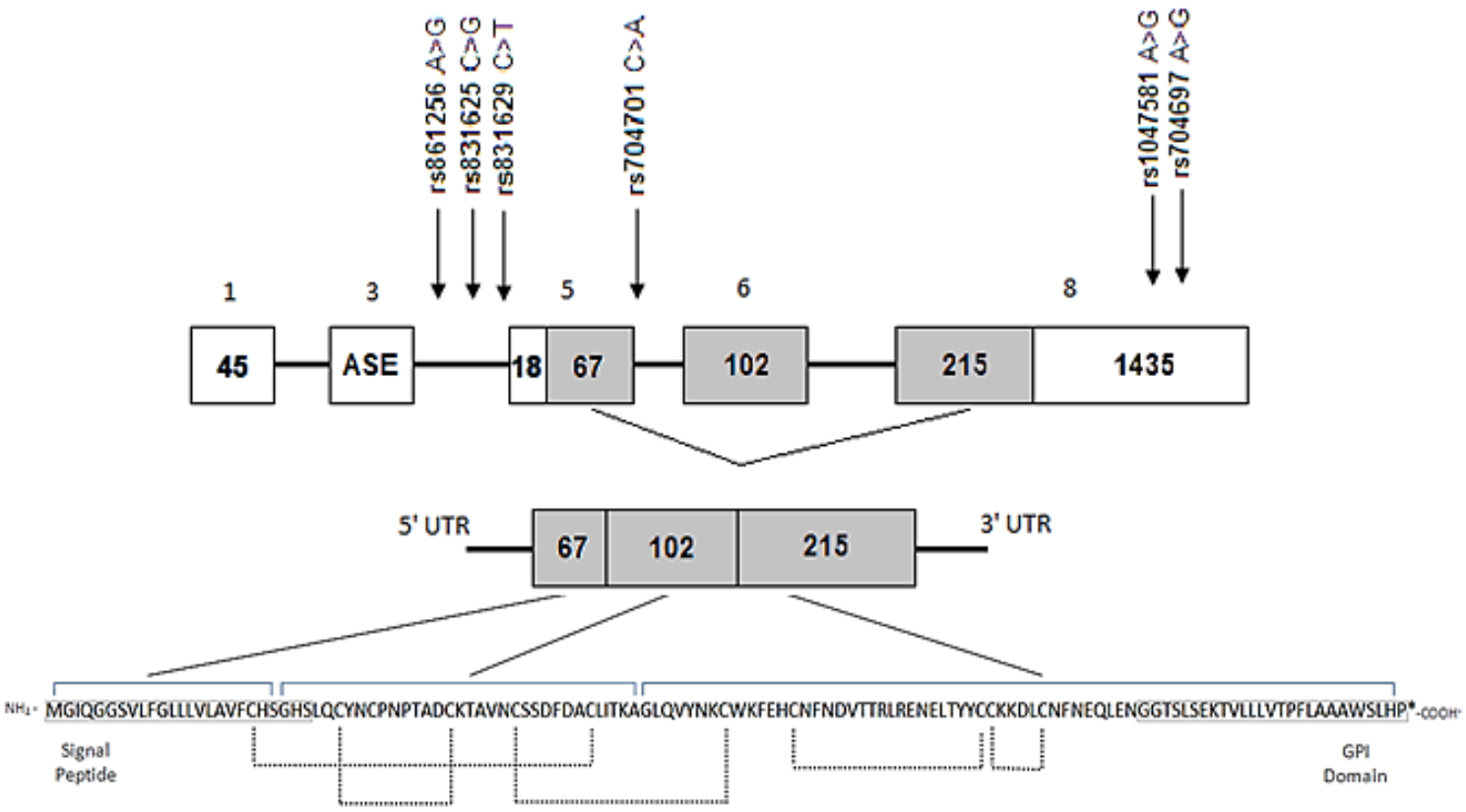


FIGURA 17: Ilustração esquemática do transcrito de *CD59*, com a localização dos SNPs investigados e o polipeptídio formado.
LEGENDA: Acima está representado o mRNA de *CD59*, que após o processamento permanece com os exons 1, 5, 6 e 8 do gene, enumerados com seus respectivos tamanhos em pares de base, e um exon alternativo (ASE – alternative splice exon), referente ao exon 3 do gene, presente na isoforma mais abundante (CD59-001). As flechas indicam as regiões onde os SNPs aqui investigados se localizam. Em cinza, estão representadas as regiões dos exons presentes no mRNA maduro (centro), que codificam para o polipeptídio de CD59 (abaixo). Os pontilhados representam as pontes dissulfeto formadas entre resíduos de cisteína, responsáveis pelo enovelamento da proteína.

Estudos sugerem que níveis baixos de expressão celular de CD59 conferem uma deficiência na proteção à lise exacerbada mediada pelo SC, ao passo que, células que a expressam em altos níveis parecem estar protegidas contra suas ações citolíticas (KIMBERLEY et al., 2007; ALEGRETTI et al., 2009). Em concordância, a proteína CD59 é expressa em altos níveis no âmnio e no sinciciotrofoblasto da placenta, em comparação com outros tecidos

humanos, mantendo o feto protegido do ataque do SC materno (SOOD et al., 2006).

2.4.2 Polimorfismos Gênicos

Mutações em certas regiões do genoma podem resultar em perda, inibição ou mudança da função proteica. Mesmo que não resultem em uma mudança estrutural, as mutações podem interferir na expressão gênica por diferentes formas: podem alterar a afinidade de regiões regulatórias com fatores de transcrição, aumentando ou diminuindo os níveis de transcrição do gene; alterar o processamento do pré-mRNA, gerando diferentes isoformas; podem interferir na estabilidade do mRNA maduro (BIDWELL, 1998).

A deficiência de CD59 pode ocorrer devido a certas mutações, que interfiram em sua estrutura ou regulação, dentre as quais são clinicamente conhecidas:

- *rs397514767*, um SNP raro encontrado em algumas famílias de origem judaica, responsável pela troca do aminoácido cisteína por tirosina. Está associado com anemia hemolítica e polineuropatia imune;
- *rs587777149* (*1-BP DEL, 146A)*, uma deleção de nucleotídeo único no exon 5 de *CD59*, resultando em uma mudança no quadro de leitura e parada prematura na tradução da proteína. Quando em homozigoze, resulta na deficiência de *CD59*, e consequentemente em anemia hemolítica com polineuropatia imune;
- deleções de nucleotídeo único no códon 16 e no códon 96, gerando mudança no quadro de leitura. Quando em homozigoze, resulta na deficiência total de CD59, e consequentemente em anemia hemolítica e hemoglobinúria paroxística noturna, porém

sem envolvimento com o sistema nervoso periférico (NEVO et al., 2013; HOCHSMANN et al., 2014).

Apesar de bem estabelecidas na literatura, estas mutações são raras nas populações, o que inviabiliza sua investigação em uma análise de associação. Selecionamos neste estudo seis SNPs frequentes nos principais grupos étnicos (TABELA 2), com possível envolvimento na regulação do gene:

- *rs704697* e *rs1047581*, situados na região reguladora 3'UTR do gene, o que os torna fortes candidatos de associação com a deficiência da proteína, devido à importância das regiões reguladoras na expressão gênica e na estabilidade dos transcritos. O *rs704697* é citado por colaboradores do projeto ENCODE por estar em região eQTL e potencialmente afetar a ligação de proteínas regulatórias (escore de 1f no RegulomeDB);
- *rs861256*, *rs831625* e *rs831629*, localizados no intron 2 do mRNA (referente ao intron 3 do gene). Estes SNPs podem exercer influência no processamento transcricional, pois flanqueiam o exon 2 alternativo presente na principal isoforma, e o exon 3 codificante. O *rs831629* também se encontra em uma região eQTL e potencialmente afeta a ligação do gene a proteínas regulatórias, além de estar inserido em uma região acentuadora, reconhecida por fatores de transcrição (escore de 1f no RegulomeDB);
- *rs704701*, localizado no intron 3, entre os exons codificadores 3 e 4.

Tabela 2. Polimorfismos de CD59 investigados e suas frequências populacionais

SNP	Região	Localização	Região no mRNA	MAF	MAF EUR	MAF AFR	MAF AMER
rs861256 *A>G*	Intron 3	*11:*33725787	Intron 2	G = 42%	37%	35%	54%
rs831625 *C>G*	Intron 3	*11:*33724890	Intron 2	G = 32%	38%	7%	51%

rs831629 *C>T*	Intron 3	*11:*33723118	Intron 2	T = 39%	38%	30%	53%
rs704701 *C>A*	Intron 5	*11:*33722133	Intron 3	C = 41%	28%	52%	25%
rs1047581 *A>G*	3’ UTR	*11:*33703446	3’ UTR	G = 21%	34%	20%	20%
rs704697 *A>G*	3’ UTR	*11:* 33703234	3’ UTR	A = 49%	41%	54%	60%

NOTA: a identificação dos SNPs segue o SNP database. O primeiro alelo é o selvagem, e o segundo é o alelo mutante. Na quarta coluna, as frequências dos alelos menos frequentes na população geral, e nas colunas seguintes, as frequências em cada população, separadamente.

LEGENDA: SNP – polimorfismo de nucleotídeo único; MAF – frequência do alelo menos comum; EUR - populações europeias, AFR – africanas, AMER – ameríndias.

FONTE: baseado em dados do SNP database (NCBI).

3. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças autoimunes, o PFE (ou fogo selvagem) é a única de caráter endêmico, com frequência de cerca de 30 casos por milhão por ano, acometendo áreas rurais da América do Sul, principalmente dos estados brasileiros de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná. Embora sua etiologia seja complexa e pouco conhecida, sabe-se que é causada por autoanticorpos que reconhecem a desmogleína 1 nos desmossomos e ativam o sistema complemento, cujos produtos de degradação de C3, C4 e C5 promovem liberação de histamina por basófilos e mastócitos, entre outras substâncias vasoativas. A deposição dos componentes finais desta cascata nos espaços intercelulares leva ao rompimento da adesão entre células da epiderme e mucosa (acantólise) e às lesões bolhosas observadas no PF e PV. A cascata do sistema complemento pode ser interrompida em vários estágios por proteínas reguladoras, entre as quais se destaca a proteína CD59 (gene *CD59*), que impede a deposição do MAC. Embora falhas na regulação do sistema complemento tenham sido propostas como causa da acantólise, não há estudos relacionando os níveis plasmáticos de proteínas reguladoras do complemento (tampouco CD59), assim como os polimorfismos em seu respectivo gene, com o PF. Polimorfismos de *CD59* poderiam ser responsáveis pela vulnerabilidade do tecido epitelial aos mecanismos líticos do SC, aumentando a susceptibilidade individual ao PFE. Neste estudo, pretende-se investigar o envolvimento da CD59 na proteção contra o PFE, e a influência de seus polimorfismos na predisposição a esta doença. O conhecimento obtido permitiria a implementação de medidas de correção de deficiências de proteínas reguladoras do complemento e a utilização de inibidores específicos para determinados estágios da cascata, aprimorando o manejo clínico desta doença e possivelmente de outras doenças bolhosas semelhantes, como o PV.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS:

- Avaliar se existe associação entre polimorfismos do gene *CD59*, com a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo endêmico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

• Otimizar uma técnica de haplotipagem por amplificação multiplex sequência-específica (PCR-SSP), para os diferentes SNPs de *CD59* selecionados

• Haplotipar Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) de marcadores do gene *CD59* em controles e em pacientes.

• Avaliar se existe associação entre os SNPs investigados no gene *CD59* com a susceptibilidade ou proteção à doença.

• Avaliar se existe associação entre os SNPs investigados no gene *CD59* com os níveis de expressão gênica do mRNA.

• Avaliar se existe correlação entre os níveis de expressão do gene *CD59* com a susceptibilidade ou proteção à doença.

5. ARTIGO

Role of CD59 Polymorphisms in Gene Expression and susceptibility to Pemphigus Foliaceus

Amanda Salviano da Silva[1], Danielle Malheiros Ferreira[1], Maria Luiza Petzl-Erler[1], Iara José de Messias-Reason[2], Angelica Beate Winter Boldt[1,2].

[1] Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

[2] Laboratory of Molecular Imunopathology, Department of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

Corresponding author

Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

Departamento de Genética

Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19071

81531-980 Curitiba, Brasil

Tel: (+5541) 3361-1553, 3361-1724

E-mail: angelicaboldt@gmail.com

ABSTRACT

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease, endemic in Brazilian rural areas and characterized by acantholysis and autoantibodies against desmosomal antigens (particularly desmoglein 1), accompanied by complement system (CS) activation and painful epidermal blisters, with generalized or localized affection. CD59 protein is an important regulator of the complement cascade, inhibiting formation of the membrane attack complex and protecting the cells from destruction, in addition to mediate signal transductions and activation of T lymphocytes, and its deficiency involved in several autoimmune diseases. CD59 has different transcripts by alternative splicing, of which only two are widely expressed in tissues, suggesting the presence of highly regulatory sites in their noncoding regions, with probable influence on isoforms. However, there is no study involving polymorphisms in *CD59* noncoding regions in autoimmune diseases, demonstrating that despite its importance, it is still a relatively unexplored gene. In the present study, we investigated six *CD59* noncoding polymorphisms with a possible effect in alternative splicing and gene expression: rs861256, rs831625, rs831629, rs704701, rs1047581 and rs704697. These SNPs were haplotyped in 157 patients and 215 controls by PCR-SSP, and gene expression was evaluated in 82 healthy subjects by real-time RT-PCR. The *G* allele of rs861256 was associated with increased gene expression (P=0.0341) and PF susceptibility in women (OR=4.11, P=0.0001), which were also more prone to develop generalized lesions (OR=4.3, P=0.009) and to not experience disease remission (OR=3.7, P=0.045). Genetic associations were also observed for the *G* allele rs831625 (OR=3.1, P=0.007) and *A* of rs704697 (OR=3.4, P=0.006) in Euro-Brazilian women, and for *C* allele of rs704701 (OR=2.33, P=0.037) in Afro-Brazilians of both sexes. These alleles constitute *GGCCAA* haplotype, which also leads to increased PF susceptibility (OR=4.9, P=0.045). Carriers of haplotypes *GG*, *CC* and *AA* (in cis or trans) have higher mRNA expression (P=0.0035), including in women, separately (P=0.029). In conclusion, higher transcriptional levels of *CD59*, as a consequence of higher gene expression or absence of mRNA degradation, seem to be related with susceptibility to PF, especially in women. This involvement may be due to transcriptional changes, leading to an excess of non-ideal isoforms, or to the CD59 role in T cell signal transduction and in cytokines release. This hypothesis should be further investigated in functional studies and the association results, replicated in independent cohorts with increasing sample sizes.

Keywords: Pemphigus foliaceus, CD59, polymorphisms, complement system

INTRODUCTION

Pemphigus is a group of autoimmune diseases, characterized by autoantibodies that recognize adhesion antigens of desmosomes, leading to disruption of intercellular bindings. This acantholytic process manifests as blisters on cutaneous or mucous regions. Pemphigus foliaceous (PF) presents, among other desmosomal proteins, desmoglein 1 as an important autoantigen. Despite rare (global incidence of 0.75-5 cases/year), PF is endemic in Brazilian rural areas, where it is popularly known as "*fogo selvagem*" ("*wild fire*") [1-3]. Treatment currently employed is not specific, mainly consisting of the use of corticosteroids, causing several side effects [1]. Furthermore, etiopathological mechanisms are not yet elucidated. It is known that it is a multifactorial disease, with genetic, immunological and environmental factors involved [4]. Several genes were described as associated with susceptibility or protection against PF: some alleles of *HLA* class II, *IL-6*, *CD1D, KIR, CD40 and CD40L* and others with immunological and inflammatory functions [5-10]

The complement system (CS) is a proteolytic cascade that recruits immunological cells, induces inflammatory responses and lyses pathogens or altered cells. Activation may occur spontaneously (alternative pathway), by the recognition of antigen-antibody complexes (classical pathway), or molecular patterns associated with pathogens or altered cells (lectin pathway). Cell destruction occurs through opsonization and phagocytosis or by forming pores on the cell membrane, through the association of C5, C6, C7 and C8 with C9 polymers (known as the Membrane Attack Complex or MAC) [11-13]. In PF, intercellular spaces of keratinocytes exhibit deposition of the complement components C3, C5, C9 and MAC [14-16]. Due to its potential destructive effects on self-tissues, complement must be controlled by regulatory proteins, highly expressed on cell membranes, whose deficiency is associated with several autoimmune diseases [17, 18].

The CD59 glycoprotein, also called protectin, is a powerful MAC inhibitor. It binds C8 and C9, preventing their insertion into the cell membrane [19-21]. Due to its protective effect, it is highly expressed on membrane cells and exosomes, through glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchorage [19, 22, 23]. Tumor cells and some enveloped virus, as a mechanism to escape complement destruction, can also express CD59 [24, 25]. Moreover, CD59 has a role in T cell signal transduction, adhesion and activation [26], tyrosine kinase-mediated activation of neutrophils [27] and cell death induction [28].

CD59 encodes a unique polypeptide of 128 amino acids and 20 kDa, by only three exons (exons 3, 4 and 5, derived from exons 4c/d, 5 and 6 of gene). Untranslated exon 2 differentiates the two most abundant transcripts: ENST00000351554 (present) and ENST00000395850 (absent) [29-31] (Figure 1). The only *CD59* mutations with clinical relevance known until now are rare (e.g. p.Cys89Tyr with 0.8% frequency in Jewish people of North African ancestry, causing demyelinating disease and chronic hemolysis) [17, 32, 33]. Nevertheless, CD59 deficiency is a common finding in adult patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). In this autoimmune condition, there is clonal expansion of hematopoietic stem cells with spontaneous mutations in the *PIGA* gene (phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A), whose product is important in GPI biosynthesis. CD59-devoid of GPI anchorage leaves erythrocytes prone to complement-mediated hemolysis [33].

CD59 expression is associated with several autoimmune diseases, as diabetes, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, autoimmune hemocytopenias, myasthenia gravis and multiple sclerosis [34-39]. We propose that common single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CD59* noncoding regions regulate transcription, translation efficiency and ultimately CD59 levels, participating in these autoimmune pathogenic mechanisms. This may be the case of PF, for increasing the vulnerability of epithelial tissue to complement-mediated lytic effects. In this work, we tested this hypothesis by haplotyping *CD59* SNPs in a case-control PF association study, and measuring transcript levels. The resulting knowledge may be used for implementing therapeutic strategies to correct deficiencies of complement regulatory proteins or for developing specific inhibitors for this protein, improving the clinical management of PF, and possibly of similar bullous diseases (such as pemphigus vulgaris).

MATERIAL AND METHODS

Subjects and samples

The National Committee for Ethics in Research (CONEP) approved this study: protocol number 505,988, signed on January 2, 2014. We recruited 157 PF patients, of which 78% were from the Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande, MS), 7% from Lar da Caridade (Hospital do Fogo Selvagem de Uberaba - Uberaba, MG), 13% from Hospital de Dermatologia Sanitária do Paraná (São

Roque, PR) and 1% from Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná (UFPR - Curitiba, PR). Inclusion criteria were positive diagnosis, based on clinical evaluation and immunohistochemistry. Exclusion criteria were familial history of autoimmune diseases and consanguinity. All participants signed a free and informed consent[1], and answered questions about clinical aspects, treatment and demographic information. We used individual ancestry reports and physical characteristics (such as facial features, skin colour, hair type, etc.) to classify them into two ethnic groups, according to the main influential ancestries of the Brazilian population: Euro-Brazilians (Brazilians with at least 75% European genetic ancestry) and Afro-Brazilians (Brazilians with at least 25% African genetic ancestry). Among PF patients, 65% were Euro-Brazilians, 56% were female and average age was 40 (12-85) years. We matched them by ethnic origin, age and sex with 215 healthy individuals (66% of the controls were from the same endemic region) (Table 1). Among the 74 patients with information about lesions type, 54 presented generalized lesions (most severe clinical form, affecting the whole body) (Table 3). DNA was extracted from peripheral blood by the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method and RNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by TRI Reagent® Solution (Thermo Fisher Scientific®, Inc., Massachusetts, USA).

Selection and haplotyping of CD59 polymorphisms

Due to variety of CD59 isoforms, we assumed that *CD59* intronic variants may modulate the acceptance of alternative splice sites and the abundance of different transcript variants. Considering this hypothesis, we selected SNPs with minor allele frequency (MAF) higher than 5% in the European, African and Amerindian populations, as reported by the 1000 Genomes Project [40], preferentially tag SNPs with $r^2 \geq 0.8$ in at least one of these populations, which could be regulating gene expression[2]. We haplotyped three SNPs located in intron 2 (rs861256 - *g.33725787C>T*, rs831625 - *g.33724890C>G* and rs831629 - *g.33723118A>G*), and one in intron 3 (rs704701 - *g.33722133T>G*) of the main transcript, using sequence-specific PCR (PCR-SSP). With the same method, we also genotyped two SNPs in the 3' untranslated region (3'UTR: rs1047581 - *g.33703446T>C* and rs704697 - *g.33703234T>C*), known regulatory region that can affect mRNA stability, translation, or have miRNA binding sites that would inhibit or degrade the transcript.

[1] O termo de consentimento livre e esclarecido encontra-se no anexo da dissertação.

[2] A tabela com as frequências populacionais reportadas para estes alelos, encontra-se no apêndice da dissertação (Tabela 1).

We carried out PCRs using 20 ng of DNA and 0.1 to 0.7 μM of each specific primer (Table 2), in the presence of 1.5 to 2.0 mM of $MgCl_2$, 0.2 mM of dNTPs, 0.2 mM of buffer and 0.5 to 3 units of Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA). All amplifications initiated with denaturation for 2 minutes at 94°C and terminated by extension for 5 minutes at 72°C. PCR-SSP multiplex enables simultaneous amplification of two or more DNA fragments and of four variants (or more) in a single reaction, using less DNA, time, material and PCR reagents. The multiplex PCR-SSP for SNPs rs861256 and rs831629, rs1047581 and rs704697, which produced fragments of 935pb and 253 bp, respectively, occurred in 33 cycles, each cycle starting with 94°C for 20 seconds, finishing with 72°C for 30 seconds. Hybridization temperature of the primers was 62°C (higher than primer melting temperature) in the first 11 cycles, 60°C (intermediate) in the following 11 cycles and 56°C in the last 11 cycles (relatively low), assuring specificity and amount of product, each for 20 seconds. After electrophoretic run in 1% agarose gel, we observed the results using SybrSafe (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA). Amplicon size must preferentially differ by at least 100 bp, in order to generate an electrophoretic pattern for quick haplotype resolution (Suppl. Figure 1). SNPs rs831629 and rs704701, whose amplicon is of 1020 bp, close to the fragment of 935 bp, were separately genotyped by conventional PCR-SSP, using the same cycling program, but with hybridization temperatures of 56°C, 54°C and 50°C. Each reaction coamplified a fragment of 431 bp of the *HGH* gene (human growth hormone) in order to control for amplification quality. We also added negative controls (complete reaction solutions without DNA) and DNA controls (samples previously known as positive or negative for the investigated genotypes) to each amplification batch.

mRNA Quantification

We measured *CD59* gene expression in 82 healthy, genotyped subjects. Following RNA concentration measurements in the 1000 version 3.7.1 Quantus™ fluorometer (Promega® Corporation, Madison, USA), we produced cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, USA) and measured *CD59* mRNA levels by quantitative real-time Taqman PCR (UNG Applied Biosystems®, USA) in ViiATM 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, USA). To this end, we used the TaqMan inventoried assay (Hs00174141_m1), with a probe specific for the exon 3 – exon 4 junction, common to the most abundant CD59 mRNA transcripts, common to the most abundant CD59 mRNA transcripts. We compared *CD59* expression levels with those of the housekeeping *GUSB* gene (Beta-glucuronidase gene, TaqMan inventoried assay 4333767F) and evaluated the results with

Viia 7 Software v.1.2 (Applied Biosystems®, USA). We considered CT values with duplicate variations ≤ 1. Fold changes were calculated by the comparative Ct method $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [41].

Statistical analysis

Allele, genotype and haplotype frequencies were determined by direct counting. Genotype distributions of control and patient groups were compared between Euro- and Afro-Brazilians, using the exact test of population differentiation of Raymond and Rousset, and were evaluated for the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium with the exact test of Guo & Thompson, implemented in the Arlequin software package v.5.1. The program Haploview v.4.2 was used to evaluate linkage disequilibrium between variants and to infer recombination sites between alleles. Extended haplotypes were reconstructed based on linkage disequilibrium and phase information (obtained by the PCR-SSP amplification). Average discrepancy between the frequencies of manually reconstructed haplotypes and those obtained with the EM algorithm (expectation maximization, implemented in Arlequin v.5.1) was 0.041%. Distribution of alleles and haplotypes between patients and controls were compared using two-tailed Fisher exact tests (program Vassarstats - http://vassarstats.net/odds2x2.html) and binary logistic regression, corrected for age of endemic patients and controls, as well as other clinical and demographic factors, with calculation of odds ratio and 95% confidence interval (STATA v.9.2). Normality tests (D'Agostino & Pearson and Shapiro-Wilk test) and comparisons between medians of *CD59* mRNA (with unpaired T Test using Welch's correction or ANOVA, for fold change values normalized in logarithmic scale) were accomplished using the program GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software). For all analysis, p values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Clinical aspects of PF patients

Among all patients with known distribution of clinical lesions, the majority of patients with generalized distribution were women (85%, compared with 58% of men), as well as among patients with active disease (76%, compared with 46% of men). There was also a trend for overrepresentation of Afro-Brazilians, among patients with generalized distribution of lesions (84%, compared with 64% Euro-Brazilian), but not among patients with active disease (Table 3). Furthermore, genotypic distribution differed greatly between Euro and Afro-Brazilian controls (P=0.0019), as well as between Euro and Afro-Brazilian patients (P<0.00008). For this reason, we corrected all genetic associations for demographic characteristics in total patient and control groups, and evaluated them separately for each ethnic group and sex.

Association analysis of CD59 polymorphisms with PF

Observed allele frequencies in controls were very similar to those observed for European and African populations of the 1000 Genomes project [40]. One exception was rs831625 in the Afro-Brazilians, probably due to European and Amerindian admixture (see discussion below) [42, 43]. Furthermore, the distribution of some alleles differed greatly between controls, patients and ethnic groups, as seen in figure 2. All 12 variants preferentially occurred in only three haplotypes: *ACCAGG, ACCCAG* and *GGTTAA,* each with around 20% frequency. Haplotype *ACCCAA* is shared by *Pan troglodytes* and probably ancestral to all others, with 2-5% frequency. Most of the other haplotypes were recombinants of lower frequency (suppl. Table 1).

Genotype distribution of haplotypes followed the predictions of Hardy-Weinberg equilibrium in all groups. We nevertheless found an excess of heterozygotes for rs861256 in Euro and Afro-Brazilian patients (P=0.002). In fact, there were more patients with the *AG* genotype of this SNP, than controls (98/157 or 62.4% vs. 104/215 or 48.4%, OR=2.24 [95%CI=1.40-3.59], P=0.001). In general, carriers of the *G* allele presented higher susceptibility to the disease (OR=1.97 [95%CI=1.21-3.23], P=0.007 – suppl. Table 1), but female carriers were much more prone to develop PF, than male (OR=4.11 [95%CI=1.96-8.60], P=0.0001). This association occurred with Euro-Brazilian females, as well as with the Afro-Brazilian females (Table 4).

Another association of susceptibility to PF, corrected for age and restricted to female subjects, occurred with the *G* allele of rs831625, in absolute linkage disequilibrium with *G* allele of rs861256 (intron 2 haplotype *GG*). The association was especially strong with females having major European ancestry (OR=3.11 [95%CI=1.36-7.12], P= 0.007). Absence of an association with Afro-Brazilian females may rely on the fact that this allele is relatively uncommon in African populations (around 1% frequency in the Yoruba population, according to the 1000 Genomes Project [40]). Its frequency in Afro-Brazilian patients is still higher, compared with African populations, probably due to high European and Amerindian admixture [42, 43]. We found the result with the Afro-Brazilian group, reflected by an association with the intron 2 *GC* haplotype, independent of sex and age distribution (OR=3.93 [95%CI=1.4-11.01], P=0.009) (Table 4).

Next to rs831629, we found an association with the *C* allele of rs704701 in intron 3 (OR=2.33 [95%CI=1.05-5.17], P=0.037), as well as with the intron 2 rs831629 – intron 3 rs704701 *CC* haplotype (OR=2.44 [95%CI=1.10-5.40], P=0.028), but only in Afro-Brazilians (regardless of sex, corrected for age) (Table 4).

In contrast, the *A* allele of rs704697, a SNP of the 3' UTR region, increased susceptibility only in Euro-Brazilian female (OR=3.35 [95%CI=1.42-7.91], P=0.006), as well as the *AA* haplotype, constituted of the *A* allele of rs1047581 and of the *A* allele of rs704697 (OR=3.79 [95%CI=1.61-8.91], P=0.002) (Supp. Table 1).

In conclusion, the reunion of the intron 2 *GG*, intron 2 – intron 3 *CC* and 3'UTR *AA* haplotypes, corresponding to *GGCCAA*, was associated with susceptibility to PF in general (OR=4.88 [95%CI=1.04-22.89], P=0.045), especially in female group (OR=9.24 [95%CI=1.09-78.59], P=0.042) (Table 4).

CD59 mRNA expression

In contrast with non-carriers, we observed an increased *CD59* mRNA expression in carriers of the *G* allele of rs861256 (P = 0.0341) and haplotypes *GG*, *CC* and *AA* (P = 0.0035), in cis or trans (Figures 3 and 4). Surprisingly, *GG*, *CC* and *AA* haplotypes were associated with susceptibility in PF, and, as genetic associations, were also associated with a higher expression in women (P = 0.0286) (Figure 5).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first genetic association study of an autoimmune disease with *CD59* common noncoding polymorphisms, and the first investigating the relation with CD59 in PF and observing a possible sexual and ethnic bias in type of PF lesions.

All associated SNPs are reported by ENCODE project collaborators to occur in a region with enhancer histone marks, especially in skin cells (data of HaploReg v.3 [44]). We found PF susceptibility associations for the *G* allele of rs861256, *GC* haplotype (corresponding to the allele *G* of rs861256 and *C* rs831625) and the total haplotype *GGCCAA* in cis or in trans (presence of *GG*, *CC* and *AA*) . Both haplotypes were also associated in afro-Brazilian separately. Specifically afro-Brazilian, it was also found associated with the disease *CC* haplotype, referring to the *C* allele of rs831629 and rs704701.

The genetic association was generally stronger in female subjects, who also seem in this study to present a higher susceptibility to generalized distribution of lesions and lower odds for disease remission. Among associated alleles exclusively or heavily for women, are A of rs704697 in Euro-Brazilian and *G* of rs861256 in Euro-Brazilian, Afro-Brazilian and combined samples. Most of the diseases included in the pemphigus spectrum are more frequent among female, but an increased proportion of PF affected women had only been reported for the Tunisian form [45, 46]. To our knowledge, this is the first report of a sex-dependent effect on genetic association with this disease, results which should be replicated in independent cohorts with larger sample sizes and evaluated with functional studies.

CD59 has an important role in inhibiting MAC deposition and complement-mediated tissue damage, and would be expected to block the acantholytic process. Surprisingly, we found an association between polymorphisms associated with higher gene expression and susceptibility to PF. Higher transcript levels do not necessarily translate into higher protein levels, however. Furthermore, we did not differentiate the levels of the two most abundant alternative transcripts, although the investigated intronic SNPs shared a potential role in alternative splicing of untranslated exon 2, included in the most abundant transcript. If in fact, higher CD59 protein levels are associated with susceptibility to PF, this may rely on their role in T cell signal transduction, responsible for protein phosphorylation events, proliferation and cytokine release in a manner similar to T cell receptor triggering [47-49]. The possibility that this molecule may direct the Th2 response typical of PF, should be further investigated in functional assays [5].

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the patients for their participation in this study and thank the staff of the Laboratório de Genética Molecular Humana/UFPR for their assistance and helpful discussions. This work was supported by grants of Fundação Araucária and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

[1] BYSTRYN, J. C.; RUDOLPH, J. L. Pemphigus.**The Lancet**, v. 366 (9479), p. 61–73, 2005.

[2] DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; FILHO, G. H.;BORGES, P.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; LABIB, R. S.;ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, V. 20 (4), P. 657–669, 1989.

[3] MEYERA, N.; MISERY L. Geoepidemiologic considerations of auto-immune pemphigus. **Autoimmunity Reviews**, v. 9 (5), p. A379–A382, 2010.

[4] CULTON, D. A.; QIAN, Y.; LI, N.; RUBENSTEIN, D.; AOKI, V.; FILHO, G. H.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. Advances in Pemphigus and its Endemic Pemphigus Foliaceus (FogoSelvagem) Phenotype: A Paradigm of Human Autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 31 (4), p. 311–324, 2008.

[5] MALHEIROS. F., D.; PANEPUCCI, R. A.; ROSELINO, A. M.; ARAÚJO, A. G.; ZAGO, M. A.; PETZL-ERLER, M. L. Genome-wide gene expression profiling reveals unsuspected molecular alterations in pemphigus foliaceus. **Immunology**, 2014.

[6] MALHEIROS. F., D. **Análise do perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4^{+} aplicada ao estudo da doença autoimune pênfigo foliáceo endêmico**. Tese de doutorado, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2009.

[7] AOKI, V.; SOUSA, J. X.; DIAZ, L. A. Pathogenesis of Endemic Pemphigus Foliaceus. **Dermatologic Clinics**, v. 29 (3), p. 413–418, 2011.

[8] PEREIRA, N. F.; HANSEN, J. A.; LIN, M. T.; ROXO, V. M. M. S.; BRAUN, K.; PETZL-ERLER, M. L. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, p. 233-241, 2004.

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

[10] MALHEIROS, F. 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, p. 547–558, 2009.

[11] BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; MESSIAS-MESSIAS-REASON, I. J. T. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. Advances in Clinical Chemistry, v. 56, p. 105-153, 2012.

[12] PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 133–149, 2011.

[13] MULLER-EBERHARD, H. J. Molecular Organization and Function of the Complement System. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 321-347, 1988.

[14] 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(3), p. 464–469, 1988.

[15] KAWANA, S; GEOGHEGAN, W. D.; JORDON, R. E.; NISHIYAMA, S. Deposition of membrane attack complex of complement in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceous skin. **The Society of Investigative Dermatology**, v. 92, p. 588-591, 1989.

[16] MESSIAS-REASON, I. J.; NISIHARA, R. M.; MOCELIN, V. Mannan-binding lectin and ficolin deposition in skin lesions of pemphigus. **Archives of Dermatological Research**, v. 303 (7), p. 521-525, 2011.

[17] HOCHSMANN, B., DOHNA-SCHWAKE, C., KYRIELEIS, H. A., PANNICKE, U., SCHREZENMEIER, H. Targeted therapy with eculizumab for inherited CD59 deficiency. **New Eng. J. Med**, v. 370, p. 90-92, 2014.

[18] CHO, H. Complement regulation: physiology and disease relevance. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 58 (7), p. 239–244, 2015.

[19] KIMBERLEY, F. C.; SIVASANKAR, B.; MORGAN, B. P. Alternative roles for CD59. **Molecular Immunology**, v. 44 (1-3), p. 73–81, 2007.

[20] HUANG, Y.; QIAO, F.; ABAGYAN, R.; HAZARD, S.; TOMLINSON, S. Defining the CD59-C9 Binding Interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 27398-27404, 2006.

[21] HUANG, Y.; FEDAROVICH, A.; TOMLINSON, S.; DAVIES, C. Crystal structure of CD59: implications for molecular recognition of the complement proteins C8 and C9 in the membrane-attack complex. **Acta Crystallography**, v. 63, p. 714–721, 2007.

[22] ALEGRETTI, A. P.; MUCENIC, T.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49(3), p. 276-87, 2009.

[23] CLAYTON, A.; HARRIS, C. L.; COURT J, MASON MD, MORGAN BP. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. **European Journal of Immunology**, v. 33(2), p. 522-531, 2003.

[24] GORTER, A.; MERI, S. Immune evasion of tumour cells using membrane-bound complement regulatory proteins. **Immunol Today**, v. 20, p. 576–582, 1999.

[25] AMET, T.; GHABRIL, M.; CHALASANI, N.; BYRD,D.; HU, N.; GRANTHAM, A.; LIU, Z.; QIN, X.; HE, J. J.; YU, Q. CD59 Incorporation Protects Hepatitis C Virus Against Complement-Mediated Destruction. **Hepatology**, v. 55 (2), p. 354-363, 2012.

[26] DECKERT, M.; KUBAR, J.; BERNARD, A. CD58 and CD59 molecules exhibit potentializing effects in T cell adhesion and activation. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 672–677, 1992.

[27] VAN DEN BERG, C. W.; CINEK, T.; HALLETT, M. B.; HOREJSI, V.; MORGAN, B. P. Exogenous glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD59 associates with kinases in membrane clusters on U937 cells and becomes Ca(2+)-signaling competent. **Journal of Cell Biology**, v. 131, p. 669–677, 1995.

[28] MONLEON, I.; MARTINEZ-LORENZO, M.J.; ANEL, A.; LASIERRA, P.; LARRAD, L.; PINEIRO, A.; NAVAL, J.; ALAVA, M.A. CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 1078–1087, 2000.

[29] PETRANKA, J. G.; FLEENOR, D. E.; SYKES, K.;KAUFMAN, R. E.; ROSSE, W. F. Structure of the CD59-encoding gene: Further evidence of a relationship to murine lymphocyte antigen Ly-6 protein (human late complement inhibitor gene). **Medical Science**, v. 89, p. 7876-7879, 1992.

[30] ENSEMBL database <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000085063;r=11:33698261-33736445>; accessed in March/2016.

[31] GTEX database < http://www.gtexportal.org/home/gene/CD59>; accessed in March/2016.

[32] NEVO, Y.; BEN-ZEEV, B.; TABIB, A.; STRAUSSBERG, R.; ANIKSTER, Y.; SHORER, Z.; FATTAL-VALEVSKI, A.; TA-SHMA, A.; AHARONI, S.; RABIE, M.; ZENVIRT, S.; GOLDSHMIDT, H.; FELLIG, Y.; SHAAG, A.; MEVORACH, D.;

ELPELEG, O. CD59 deficiency is associated with chronic hemolysis and childhood relapsing immune-mediated polyneuropathy. **Blood**, v. 121, p. 129-135, 2013.

[33] MEVORACH, D. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and primary p.Cys89Tyr mutation in CD59: Differences and similarities. **Molecular Immunology**, v. 67 (1), p. 51-55, 2015.

[34] ACOSTA, J.; HETTINGA, J.; FLUCKIGER, R.; KRUMREI, N.; GOLDFINE, A.; ANGARITA, L.; HALPERIN, J. Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 5450-5455, 2000.

[35] KINDERLERER, A. R.; STEINBERG, R.; JOHNS, M.; HARTEN, S. K.; LIDINGTON, E. A.; HASKARD, D. O.; MAXWELL, P. H.; MASON, J. C. Statin-induced expression of CD59 on vascular endothelium in hypoxia: a potential mechanism for the anti-inflammatory actions of statins in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.8 (4), 2006.

[36] ALEGRETTI, A. P.; MUCENIC, T.; MERZONI C. J.; FAULHABER, D. G. A.; SILLA, L. M..; XAVIER, R. M. Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. **Cellular Immunology**, v. 265, p. 127–132, 2010.

[37] RUIZ-ARGÜELLES, A. A.; LLORENTE, L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, p. 155–161, 2007.

[38] KUSNER, L. L.; KAMINSKI, H. J. The role of complement in experimental autoimmune myasthenia gravis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1274, p. 127-32, 2012.

[39] UZAWA, A.; MORI, M.; UCHIDA, T.; MASUDA, H.; OHTANI, R.; KUWABARA, S. Increased levels of CSF CD59 in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 30;453, p.131-3, 2016.

[40] 1000 Genomes Project (http://www.1000genomes.org/1000-genomes-browsers

[41] LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. **Methods**, v.25, p. 402-408, 2001.

[42] BRAUN-PRADO K, VIEIRA MION AL, FARAH PN, CULPI L, PETZL-ERLER ML. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v. 56:417, 2000.

[43] PROBST, C.M.; BOMPEIXE, E.P.; PEREIRA, N.F.; DE O DALALIO M.M.; VISENTAINER, J.E.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L. HLA polymorphisms and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Human Biology**, v. 72, p. 597-617, 2000.

[44] HAPLOREG database < http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php >; accessed in March/2016.

[45] BASTUJI-GARIN, S.; SOUISSI, R.; BLUM, L.; TURKI, H.; NOUIRA, R.; JOMAA, B.; ZAHAF, A.; BEN OSMAN A.; MOKHTAR, I.; FAZAA, B.; REVUZ, J.; ROUJEAU, J. C.; KAMOUN, M. R. Comparative Epidemiology of Pemphigus in Tunisia and France: Unusual Incidence of Pemphigus Foliaceus in Young Tunisian Women. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 2, p. 302–305, 1996.

[46] ALPSOY, E.; AKMAN-KARAKAS, A.; UZUN, S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. **Arch Dermatol Res**., v. 307(4), p. 291-8, 2015.

[47] DECKERT, M.; TICCHIONI, M.; MARI, B.; MARY, D.; BERNARD, A. The glycosylphosphatidylinositol-anchored CD59 protein stimulates both T cell receptor zeta/ZAP-70-dependent and -independent signaling pathways in T cells. **Eur J Immunol** 25: 1815–1822, 1995.

[48] KORTY, P. E.; BRANDO, C.; SHEVACH, E. M. CD59 functions as a signaltransducing molecule for human T cell activation. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 4092–4098, 1991.

[49] LIPP, A. M.; JUHASZ, K.; PAAR, C.; OGRIS C; ECKERSTORFER, P.; THUENAUER, R.; HESSE, J.; NIMMERVOLL, B.; STOCKINGER, H.; SCHÜTZ, G. J.; BODENHOFER, U.; BALOGI, Z.; SONNLEITNER, A. Lck mediates signal transmission from CD59 to the TCR/CD3 pathway in Jurkat T cells. **PLoS One**, v. 9 (1), 2014.

[41] REGULOME database < http://www.regulomedb.org/ >; accessed in March/2016.

[42] BOYLE AP, HONG EL, HARIHARAN M, CHENG Y, SCHAUB MA, KASOWSKI M, KARCZEWSKI KJ, PARK J, HITZ BC, WENG S, CHERRY JM, SNYDER M. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22(9):1790-1797, 2012.

Table 1. Demographic characteristics of PF patients, according to ethnicity.

	Euro-Brazilian	n	Afro-Brazilian	n	Total Patients	n
Total (%)	64.9	102	35	55	42.2	157
Average Age (min-max)	42 (12-85)	100	37 (12-75)	54	40 (12-85)	154
Female (%)	56.8	58 (of 102)	54.5	30 (of 55)	56	88
Generalized lesions (%)	64.2	27 (of 42)	84.8	27 (of 32)	72.9	54 (of 74)
Generalized lesions (women) (%)	66.7	18 (of 27)	63	17 (of 27)	64.8	35 (of 55)
Located lesions (men) (%)	66.7	10 (of 15)	80	4 (of 5)	70	14 (of 20)
Treatment (%)	69.2	83	30.8	37	85.7	120 (of 140)
Remission (%)	55	11	45	9	12.7	20
First lesion average age (min-max)	31 (7-82)	96	28 (0-75)	50	30 (0-82)	146

n: number of individuals.

Table 2. Sequence-specific primers for *CD59* SNPs

Forward Primers			Reverse primers			
SNP	**Gene region**	**5'→3' Sequence**	**SNP**	**Gene region**	**5'→3' Sequence**	**Fragment**
rs861256	Intron 3	CATTACTTTTCCTGGCTATGC**G** CATTACTTTTCCTGGCTATGC**A**	**rs831625**	Intron 3	CAAGGTCGGGCTGTTC**C** CAAGGTCGGGCTGTTC**G**	935 bp
rs831629	Intron 3	GCAAGTTCAAAACCTCCC**C** GCAAGTTCAAAACCTCCC**T**	**rs704701**	Intron 5	AAACTTCAGCCGCCGA**T** AAACTTCAGCCGCCGA**G**	1020 bp
rs1047581	3' UTR	AGTGGAGAGGTAGGTGAC**G** AGTGGAGAGGTAGGTGAC**A**	**rs704697**	3' UTR	CAAACTTGGTTTCTCTAACAAG**C** CAAACTTGGTTTCTCTAACAAG**T**	253 bp
Control	*HGH* f	TGCCTTCCCAACCATTCCCTT**A**		*HGH* r	CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTT**C**	431 bp

In bold: variant nucleotide; SNP: Single Nucleotide Polymorphisms; *HGH*: Human Growth Hormone; f: forward; r: reverse; bp: base pairs.

Table 3. Presence and distribution of PF lesions, according to demographic characteristics.

		Generalized		**Localized**					**Active disease**		**In remission ***			
	N	n	%	n	%	OR	[95% CI]	N	n	%	n	%	OR	[95% CI]
F	41	35	85	6	15	4.298	[1.42-13.01] P= 0.0094	25	19	76	6	24	3.69	[1.11-12.25] P=0.045
M	33	19	58	14	42			26	12	46	14	54		
EU	42	27	64	15	36	0.333	[0.11-1.05] P= 0.067	25	14	56	11	44		n.s.
AF	32	27	84	5	16			26	17	65	9	35		
Total	74	54		20				51	31		20			

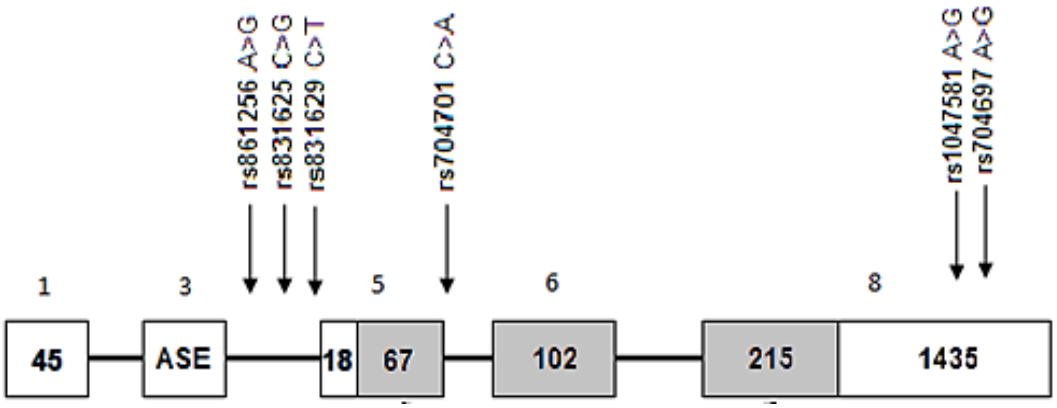
N = total number of individuals with available data; n= number of individuals; OR = Odds Ratio; [95%CI] = 95% Confidence Interval; P = p value (Fisher's exact test); F = female patients; M = male patients; EU = Euro-Brazilian; AF = Afro-Brazilian; n.s. not significant. * including patients in total remission (without current symptoms).

Table 4. Observed associations between *CD59* polymorphisms and pemphigus foliaceus.

SNP / Haplotype	mRNA Region	mRNA Expression	mRNA *p value*	Effect	Ethnicity	Sex	*p value*	OR	[95% CI]
G allele of rs861256	Intron 2	Increase	*0.0243*	Susceptibility	Total	M/F	*0.007*	1.97	1.21 – 3.23
					Total	F	*0.000*	4.106	1.96 – 8.6
					EUR	F	*0.001*	4.404	1.84 - 10.56
					AFR	F	*0.043*	5.487	1.05 – 28.63
G allele of rs831625	Intron 2	Increase	*0.0267*	Susceptibility	EUR	F	*0.007*	3.107	1.36 – 7.12
C allele of rs704701	Intron 3	-	-	Susceptibility	AFR	M/F	*0.037*	2.332	1.05 – 5.17
A allele of rs704697	3' UTR	Increase	*0.037*	Susceptibility	EUR	F	*0.006*	3.354	1.42 – 7.91
GC (locus 1)	Intron 2	-	-	Susceptibility	Total	-	*0.011*	2.992	1.28 – 6.98
					Afro	-	*0.009*	3.927	1.4 – 11
GGCCAA	All loci	-	-	Susceptibility	Total	F/M	*0.045*	4.877	1.04 – 22.9
						F	*0.042*	9.244	1.09 – 78.58

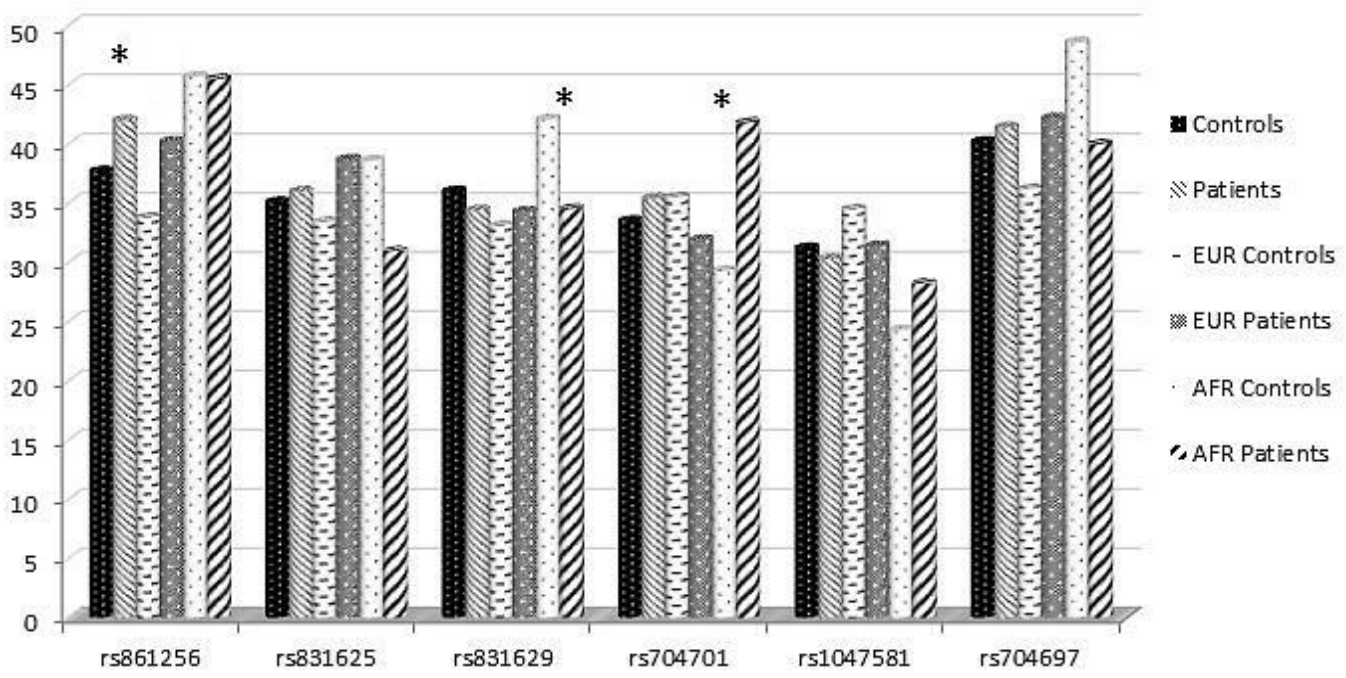
Logistic regression values for main allelic and haplotypic associations to PF susceptibility, by ethnicity and sex, and differential mRNA expressions. Some associations were found in Euro-Brazilians (EUR) and/or Afro-Brazilians (AFR), separately; "Total" refers to joined groups.

Figure 1. *CD59* gene structure and localization of investigated SNPs.



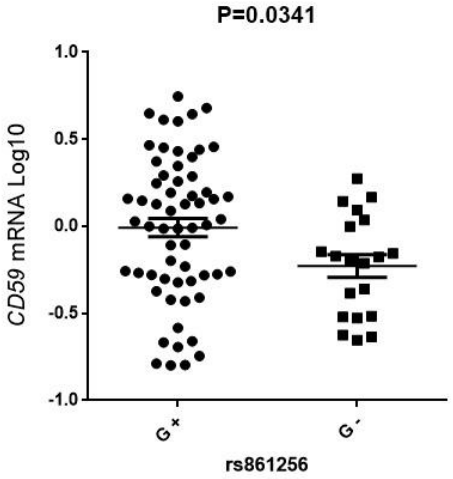
Inclusion of exon 2 (ASE - alternatively spliced exon) occurs in the main transcript isoform (ENST00000351554). Exclusion of this exon is the difference to the second most abundant transcript (ENST00000395850). Boxes represent exons, with their respective sizes in base pairs. In gray: coding regions. Arrows indicate approximate location of the investigated SNPs.

Figure 2. Observed Minor Allele Frequencies of investigated CD59 SNPs



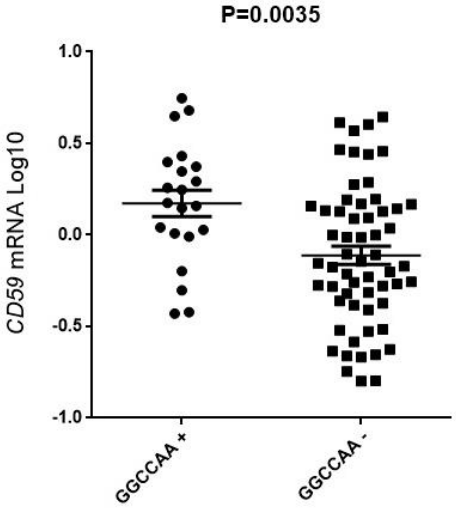
CD59 SNPs minor allele frequencies observed in controls and patients, by ethnicity. EUR – Euro-Brazilians; AFR – Afro-Brazilian. *general allelic association, by bicaudal Fisher test, respectively: p = 0.0258; p = 0.0058; p = 0.0285. All values are showed in Table 1, in appendix of dissertation.

Figure 3. Carriers of *CD59* variant and differential mRNA expression.



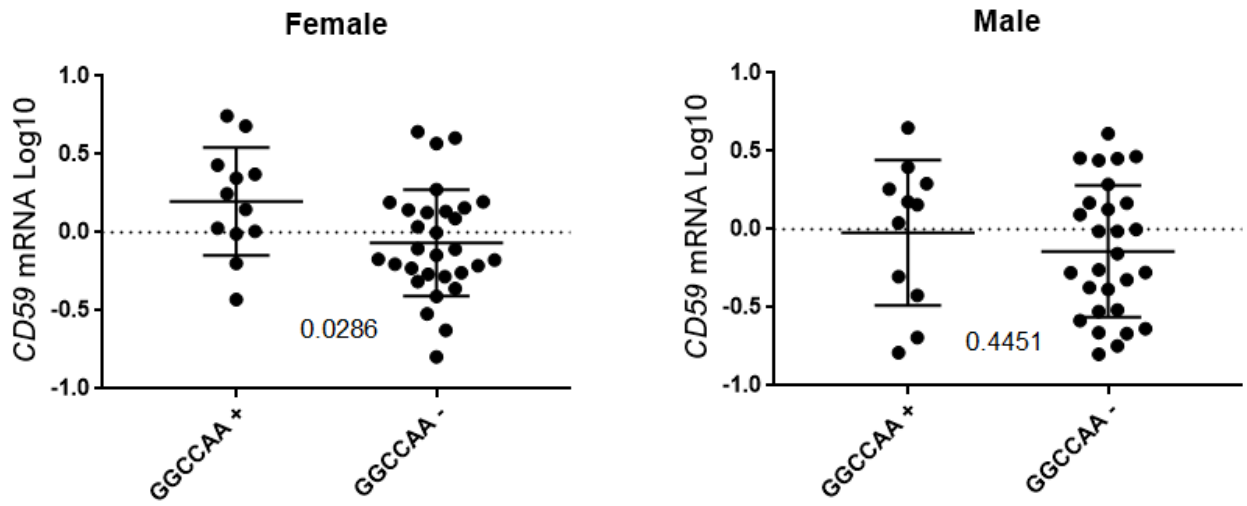
CD59 mRNA expression between carriers and non-carriers of *G* allele of rs861256. Expression values were normalized in logarithmic scale and were evaluated in 82 healthy individuals.

Figure 4. *CD59* haplotypes and differential mRNA expression.



CD59 mRNA expression between carriers and non-carriers of the *GGCCAA* haplotype. Expression values were normalized in logarithmic scale and were evaluated in 82 healthy individuals.

Figure 5. *CD59* haplotype and differential mRNA expression, by sex.



CD59 mRNA expression between female and male carriers and non-carriers of the *GGCCAA* haplotype. Expression values were normalized in logarithmic scale and were evaluated in 82 healthy individuals.

Supp. Table 1. Haplotypic CD59 frequencies

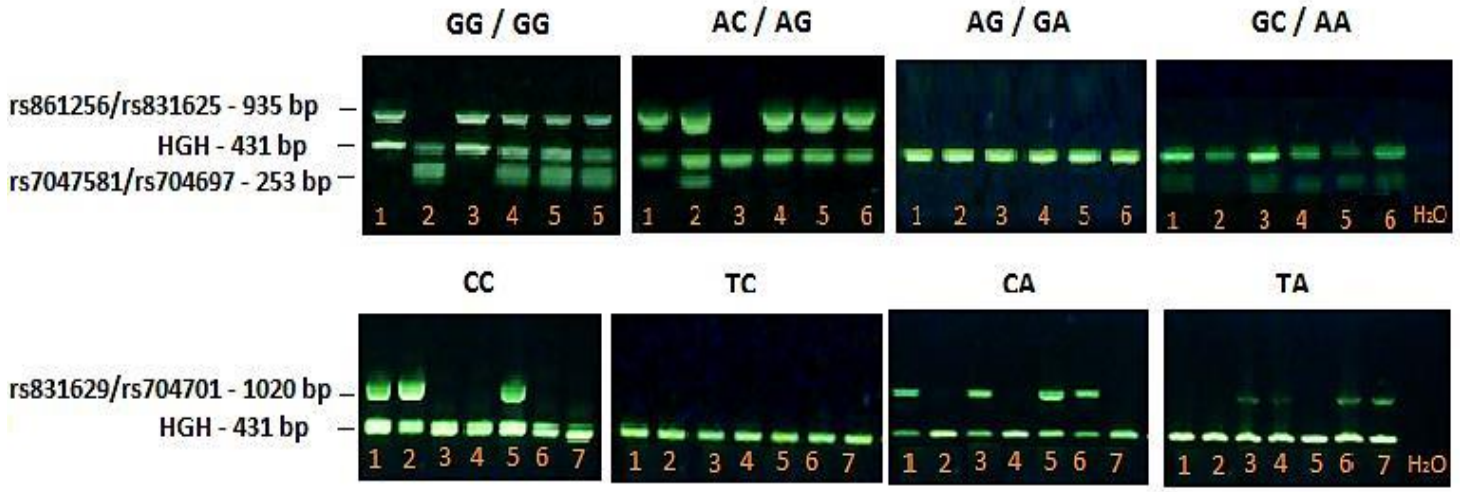
	EURO-BRAZILIANS					AFRO-BRAZILIANS					TOTAL				
	Controls		Patients		*p*	Controls		Patients		*p*	Controls		Patients		***p***
Locus 1	n	*%*	n	*%*		n	*%*	n	*%*		n	*%*	n	*%*	
AC	189	65.2	119	58.3		76	54.3	58	51.8		265	61.6	177	56	
AG	3	1	3	1.4		1	0.7	2	1.8		4	0.9	5	1.6	
GG	94	32.4	76	37.3		53	37.9	32	28.6		147	34.2	108	34.2	
GC	4	1.3	6	2.9		10	7.1	18	16.1	0.028 OR=2.49	14	3.3	24	7.6	0.0107 OR=2.44
Locus 2															
CC	104	35.9	65	31.9		40	28.6	46	41.1	0.045 OR=1.74	144	33.5	111	35.1	
CA	90	31	69	33.8		41	29.3	26	23.2		131	30.5	95	30.1	
TA	96	33.1	70	34.3		59	42.1	38	33.9		155	36.1	108	34.2	
TC	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
Locus 3															
AG	86	29.7	55	29.9		39	27.9	39	34.8		125	29.1	94	29.8	
GG	99	34.1	63	30.9		33	23.6	27	24.1		132	30.7	90	28.5	
AA	103	35.5	85	41.7		67	47.9	40	35.7	0.055 OR=0.61	170	39.5	125	39.6	
GA	2	0.7	1	0.5		1	0.7	4	3.6		3	0.7	5	1.6	
All loci															
ACCCAG	76	26.2	40	19.6		29	20.7	28	25		105	24.4	68	21.5	

ACCAGG	80	27.6	51	25		26	18.6	18	16.1		106	24.6	69	21.8	
GGTAAA	87	30	60	29.4		51	36.4	25	22.3	0.0263 OR=0.51	138	32.1	85	26.9	
ACCAAG	6	2.1	8	3.9		5	3.6	2	1.8		11	2.6	10	8.9	
ACCCGG	17	5.9	11	5.4		0	0	2	1.8		17	4	13	11.6	
ACCCAA	6	2.1	2	1		5	3.6	5	4.5		11	2.6	7	6.3	
ACCAAA	1	0.3	3	1.5		3	2.1	0	0		4	1	3	1	
GGCCAA	2	0.7	7	3.4	0.0369 OR=5.11	1	0.7	3	2.7		3	1	10	3.2	0.0196 OR=4.65
GGCAAA	2	0.7	6	2.9		3	2.1	0	0		5	1.2	6	1.9	
GGTAAG	2	0.7	2	1		0	0	2	1.8		2	1	4	1.3	
GCTAAA	3	1	1	0.5		2	1.4	6	5.4		5	1.2	7	2.2	
GCTAAG	1	0.5	0	0		1	0.7	1	0.9		2	0.5	1	0.3	
ACCAGA	1	0.3	1	0.5		0	0	1	0.9		1	0.2	2	0.6	
ACCCGA	1	0.3	0	0		1	0.7	1	0.9		2	0.5	1	0.3	
ACTAGG	1	0.3	1	0.5		0	0	2	1.8		1	0.2	3	1	
AGCCAG	1	0.3	0	0		0	0	0	0		1	0.2	0	0	
AGTAAA	2	0.7	2	1		0	0	1	0.9		2	0.5	3	1	
GGCCAG	1	0.3	1	0.5		0	0	1	0.9		1	0.2	2	0.7	
GCCAAA	0	0	0	0		1	0.7	0	0		1	0.2	0	0	
GCCAGG	0	0	0	0		3	2.1	1	0.9		3	0.7	1	0.3	
GCCCGG	0	0	0	0		1	0.7	3	2.7		1	0.2	3	1	
GCCCAG	0	0	0	0		1	0.7	3	2.7		1	0.2	3	1	
GCTAGG	0	0	0	0		1	0.7	0	0		1	0.2	0	0	
ACTAAA	0	0	0	0		1	0.7	0	0		1	0.2	0	0	

ACTAAG	0	0	2	1	3	2.1	0	0	3	0.7	2	0.6
ACTAGA	0	0	0	0	0	0	1	0.9	0	0	1	0.3
GCCAGA	0	0	0	0	0	0	1	0.9	0	0	1	0.3
AGCAAG	0	0	0	0	0	0	1	0.9	0	0	1	0.3

Exact P values were obtained by bicaudal Fisher's test and are shown for significant differences ($p < 0.05$) or for trend of significance. The values of OR and confidence intervals are shown in table 4.

Supp. Figure 1. Electrophoretic pattern of *C59* PCR-SSP amplification.

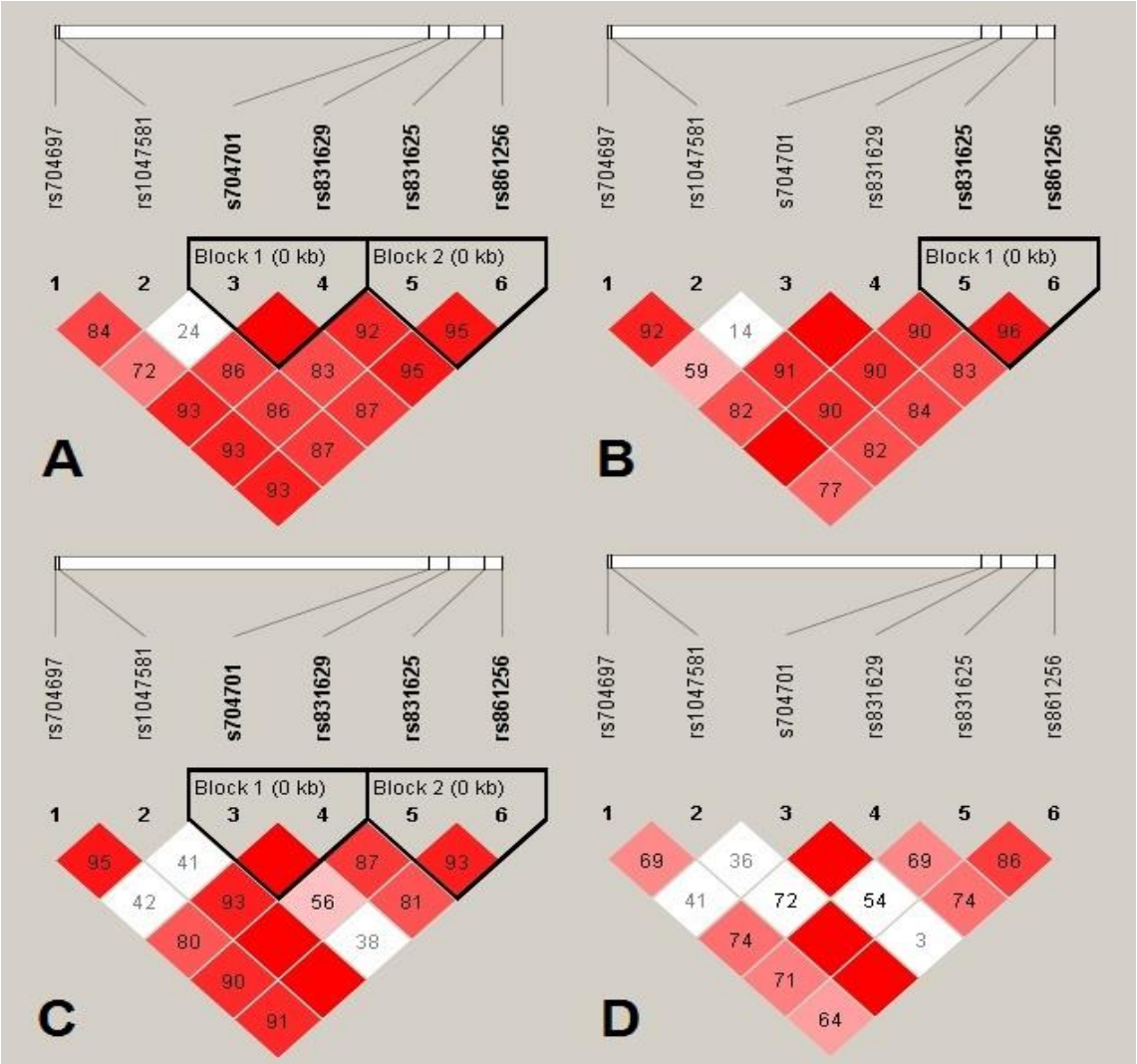


	1	2	3	4	5	6	7
rs861256	AG	AA	GG	AG	AG	AG	-
rs831625	CG	CC	GG	GC	GC	GC	-
rs831629	CC	CC	CT	TT	CC	CT	TT
rs704701	CA	CC	AA	AA	CA	AA	AA
rs1047581	AA	AG	AA	AG	AG	AG	-
rs704697	AA	GG	AA	AG	AG	AG	-

Hapl. Locus 1	AC/GG	AC/AC	GG/GG	AC/GG	AC/GG	AC/GG	-
Hapl. Locus 2	CC/CA	CC/CC	CA/TA	TA/TA	CC/CA	CA/TA	TA/TA
Hapl. Locus 3	AA/AA	AG/GG	AA/AA	AA/GG	AA/GG	AA/GG	-
Total haplotype	ACCAAA GGCCAA	ACCCAG ACCCGG	GGTAAA GGCAAA	GGTAAA ACTAGG	ACCAGG GGCCAA	ACCAGG GGTAAA	--TA-- --TA--

Electrophoretic run of fragments amplified by PCR-SSP, in agarose gel. Numbers represents individuals genotyped for the SNPs. (A) PCR-SSP multiplex for *rs861256* (A/G) - *rs831625* (C/G), with a fragment of 935 bp (locus 1), and for *rs1047581* (A/G) – *rs704697* (G/A), with 253 bp (locus 3). In the middle, the endogenous control *HGH*, with 431 bp. (B) PCR-SSP simple for rs831629 (C/T) and rs704701 (C/A), with 1020 bp (locus 2). (C) Table with individual genotypes, haplotypes per locus and total haplotype.

Supp. Figure 2. Relative linkage disequilibrium (D') in PF controls (A and B) and patients (C and D).



Linkage disequilibrium plot of investigated polymorphisms, observed in (A) Euro-Brazilian controls; (B) Afro-Brazilians controls; (C) Euro-Brazilian patients; (D) Afro-Brazilian patients. Euro-Brazilians controls and patients present the same linkage blocks for intronic SNPs, despite the higher frequency of recombinants in patients. Afro-Brazilians controls present a unique linkage block, while patients in this group have no block, due to elevated frequency of recombinants.

6. DISCUSSÃO FINAL

CD59 é uma importante proteína reguladora do sistema complemento, ligando-se a C8 e C9 e impedindo a formação do MAC na membrana das células. Devido a seu efeito protetor, é amplamente expressa na maior parte dos tecidos e em todas as células circulantes, e sua deficiência tem sido estudada em diversas doenças autoimunes. Contudo, ainda se trata de um gene pouco compreendido, sendo suas únicas mutações de relevância clínica conhecidas até então, presentes em regiões de exons, altamente deletérias e raras, o que as impossibilitam de serem investigadas em um estudo de associação. Mutações em introns, apesar de possuírem um potencial efeito na regulação e no processamento alternativo do gene, ainda são pouco exploradas. Este é o primeiro estudo de associação genética entre polimorfismos comuns não codificadores de *CD59* com uma doença autoimune, e especificamente no pênfigo foliáceo.

Investigamos polimorfismos de *CD59* frequentes nas principais populações, em regiões genômicas que possam interferir na estabilidade do mRNA, como rs1047581 e rs704697 na região não traduzida a 3', ou que possam interferir no processamento alternativo do gene, como rs861256, rs831625, rs831629 e rs704701, que flanqueiam o exon 2 alternativo, presente na principal isoforma. Para a haplotipagem física destas variantes não codificadoras com possível impacto funcional, desenvolvemos uma PCR-SSP multiplex, na qual 4 SNPs foram haplotipados em 4 reações, ao invés de 8 reações, que seriam necessárias em uma PCR-SSP comum. Desta forma, foi possível reduzir o consumo de reagentes, plásticos e tempo, pela metade.

A distribuição dos polimorfismos se deu de acordo com o esperado pelas frequências reportadas no projeto 1000 Genomes para populações euro e afro-descendentes, exceto para o alelo *G* de rs831625, que apresentou uma frequência muito mais elevada em afro-brasileiros. Este aumento de frequência pode ser explicado, levando-se em consideração a alta taxa de miscigenação deste grupo, tanto com euro-descendentes quanto com ameríndios, de acordo com dados do nosso grupo para genes HLA de classe I e II (PROBST et al., 2000; BRAUN-PRADO et al.,

2000). Os seis polimorfismos ocorreram principalmente em três haplótipos mais comuns, com cerca de 20% de frequência: *ACCAGG, ACCCAG* e *GGTTAA.*

Reunindo euro-brasileiros e afro-brasileiros em um único grupo total, encontramos associações de susceptibilidade ao PF para o alelo *G* de rs861256, para o haplótipo *GC* (referente aos alelos *G* de rs861256 e *C* de rs831625) e para o haplótipo total *GGCCAA*, em cis ou em trans (presença de *GG*, *CC* e *AA*). Ambos os haplótipos também foram associados em afro-brasileiros, separadamente. Especificamente em afro-brasileiros, também foi encontrado associado à doença o haplótipo *CC*, referente aos alelos *C* de rs831629 e de rs704701.

Contudo, nos chamou bastante a atenção que ao analisar homens e mulheres separadamente, alguns SNPs foram associados unicamente ou mais fortemente em mulheres, como os alelos *A* de rs704697 em euro-brasileiras e *G* de rs861256 em euro-brasileiras, afro-brasileiras e amostras reunidas. Além disso, observamos uma maior propensão a lesões generalizadas em pacientes mulheres, assim como uma maior dificuldade em atingir a remissão da doença, em contraste com pacientes homens, que por sua vez possuem maior tendência a lesões do tipo localizadas. Essas diferenças significativas de manifestações clínicas de PF entre pacientes homens e mulheres parecem corroborar as diferenças de susceptibilidade observadas entre os mesmos. Com exceção da Tunísia, onde foi reportado um maior número de casos de PF entre mulheres (BASTUJI-GARIN et al., 1996), nenhuma predisposição sexual e/ou associação de formas clínicas de PF entre os sexos foram reportadas na literatura até então, apesar de já estar bem estabelecida uma maior predisposição a doenças autoimunes em mulheres (GLEICHER et al., 2007).

A partir de informações dos bancos de dados HaploReg v.3 e Regulome, verificamos que todos os SNPs associados estão citados por colaboradores do projeto ENCODE como presentes em regiões regulatórias, especialmente em células da pele. Dentre estes, destacam-se os SNPs rs831629 (intron 2), presente em uma região intensificadora, e rs704697 (3’ UTR). Estes dois SNPs estão em eQTLs e parecem interferir diretamente na ligação de alguns fatores regulatórios e transcricionais (escore de 1f no Regulome). De fato, o rs704697 foi associado com a susceptibilidade ao PF em euro-brasileiras, enquanto o rs831629, apesar de não ter apresentado associação na regressão logística, foi encontrado associado com a proteção ao PF

pelo teste de Fisher bicaudal (p = 0,0058), e poderá ser melhor analisado com o aumento da amostra.

A partir dos resultados de expressão gênica, foram associados com maiores níveis de *CD59* o alelo *G* de rs861256, e a presença conjunta dos três haplótipos *GG*, *CC*, e *AA,* em cis ou em trans, ambos encontrados associados com a susceptibilidade à doença. Estes níveis aumentados podem ser consequência de um possível interferência destes polimorfismos na degradação do mRNA, levando a um acúmulo desnecessário de transcritos, o por induzirem o aumento da expressão gênica. É importante lembrar, contudo, que altos níveis de expressão de mRNA não necessariamente correspondem a altos níveis de proteína, principalmente em genes que transcrevem diferentes isoformas por processamento alternativo, como o *CD59*. Uma possibilidade é que estes alelos estejam interferindo no reconhecimento de sítios de processamento alternativo, transcrevendo um excesso de isoformas não funcionais ou não eficientes na produção da proteína, seja por alterações na estabilidade do mRNA ou por inadequada ligação ao ribossomo. Outra provável hipótese é de que altos níveis da proteína CD59 estejam aumentando de fato a susceptibilidade ao PF, e/ou o agravamento clínico, por aumentar a transdução de sinais em células T, responsáveis por fosforilações proteicas e ativação de citocinas, características de resposta Th2, típicas de PF. Contudo, estas hipóteses devem ser investigadas através de ensaios funcionais.

Em suma, polimorfismos presentes em regiões não codificadoras de *CD59* foram aqui encontrados alterando a regulação e expressão gênica, e possivelmente modulando a susceptibilidade ao PF. A maior expressão de *CD59* foi associada com polimorfismos associados com a susceptibilidade ao PF, e portanto parece estar relacionada com o aumento da susceptibilidade e/ou agravamento da doença, principalmente em mulheres, que foram observadas neste estudo apresentando uma maior propensão a formas clínicas mais graves. Os SNPs associados parecem estar localizados em importantes sítios regulatórios do gene, até então pouco explorados. Estes resultados e as hipóteses associadas, se confirmadas, lançarão nova luz sobre mecanismos patogênicos do pênfigo foliáceo, que poderão ser explorados para aprimorar o tratamento.

7. CONCLUSÕES

Por meio deste trabalho, foi possível:

1. O desenvolvimento de uma estratégia rápida e econômica de haplotipagem física do gene *CD59,* por meio de amplificação utilizando quatro iniciadores sequência-específicos, por reação;
2. A descrição da distribuição de polimorfismos e haplótipos na população estudada, de acordo com a composição étnica;
3. A constatação da existência de associação entre o alelo *G* de rs861256 com o pênfigo foliáceo;
4. A constatação de que este alelo aumenta a susceptibilidade principalmente em mulheres (em torno de 4 vezes), as quais também apresentaram maior associação com a apresentação generalizada de lesões e ausência de remissão da doença;
5. A constatação de que algumas associações de susceptibilidade foram específicas para certo grupo étnico, como os alelos *G* de rs831625 e *A* de rs704697, os quais aumentam até 3 vezes a susceptibilidade à doença, em mulheres de ascendência europeia, e o alelo *C* de rs704701, o qual ocorre preferencialmente em pacientes afrodescendentes (aumento de até duas vezes, na susceptibilidade);
6. A constatação de que os alelos associados constituem o haplótipo *GGCCAA*, o qual também foi associado ao pênfigo foliáceo, independentemente de fatores demográficos;
7. A observação de que três dos alelos associados à doença também estão associados com o aumento da expressão gênica, principalmente quando presentes no haplótipo comum, *GGTAAA.*
8. A apresentação da possibilidade de que a expressão elevada do gene *CD59,* devido aos polimorfismos identificados com efeito funcional, pode aumentar a susceptibilidade ao pênfigo foliáceo.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, J.; HETTINGA, J.; FLUCKIGER, R.; KRUMREI, N.; GOLDFINE, A.; ANGARITA, L.; HALPERIN, J. Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 5450-5455, 2000.

ALEGRETTI, A. P.; MUCENIC, T.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49(3), p. 276-87, 2009.

ALEGRETTI, A. P.; MUCENIC, T.; MERZONI C. J.; FAULHABER, D. G. A.; SILLA, L. M..; XAVIER, R. M. Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. **Cellular Immunology**, v. 265, p. 127–132, 2010.

ALEGRETTI, A. P.; SCHNEIDER, L.; PICCOLI, A. K.; XAVIER, R. M. The role of complement regulatory proteins in peripheral blood cells of patients with systemic lupus erythematosus: Review. **Cellular Immunology**, v. 277, p. 1–7, 2012.

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 (2), p. 167–170, 1999.

AMET, T.; GHABRIL, M.; CHALASANI, N.; BYRD,D.; HU, N.; GRANTHAM, A.; LIU, Z.; QIN, X.; HE, J. J.; YU, Q. CD59 Incorporation Protects Hepatitis C Virus Against Complement-Mediated Destruction. **Hepatology**, v. 55 (2), p. 354-363, 2012.

AMORMINO, S. A. F.; BARBOSA, A. A. M. Pênfigo vulgar: revisão de literatura e relato de caso clínico. **Revista Periodontia**, v. 20, n° 02, 2010.

AOKI, V.; MILLIKAN, R. C.; RIVITTI, E. A.; FILHO, G. H.; EATON, D. P.; WARREN, S. J. P.; LI, N.; VARGAS, J. H.; HOFFMANN, R. G.; DIAZ, L. A. Environmental Risk Factors in Endemic Pemphigus Foliaceus (FogoSelvagem).**Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 9, p. 34–40, 2004.

AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; ITO, L. M.; HANS-FILHO, G.; DIAZ, L. A. Perfil histórico da imunopatogenia do pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 287-292, 2005.

AOKI, V.; SOUSA, J. X.; DIAZ, L. A. Pathogenesis of Endemic Pemphigus Foliaceus. **Dermatologic Clinics**, V. 29 (3), p. 413–418, 2011.

ARAÚJO, F. R. B.; SILVA GUIMARÃES, K. **Análise de abordagens computacionais na interação SNP-SNP e aumento do risco a doenças**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

ARRUDA, M. M. A. S.; RODRIGUES, C. A.; YAMAMOTO, M.; FIQUEIREDO, M. S. Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 214-221, 2010.

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

BASTUJI-GARIN, S.; SOUISSI, R.; BLUM, L.; TURKI, H.; NOUIRA, R.; JOMAA, B.; ZAHAF, A.; BEN OSMAN A.; MOKHTAR, I.; FAZAA, B.; REVUZ, J.; ROUJEAU, J. C.; KAMOUN, M. R. Comparative Epidemiology of Pemphigus in Tunisia and France: Unusual Incidence of Pemphigus Foliaceus in Young Tunisian Women. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 2, p. 302–305, 1996.

BIDWELL, J. P. Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. **J Bone Miner Res**, v. 13, p. 155–167, 1998.

BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; MESSIAS-MESSIAS-REASON, I. J. T. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. Advances in Clinical Chemistry, v. 56, p. 105-153, 2012.

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

BRAUN-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M. L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 314–321, 2007.

BRENNER, M. K.;WULF, G. G.; RILL, D. R.;LUO, K. L.;GOODELL, M. A.; MEI, Z.; KUEHNLE, I.;BROWN, M. P.;PULÉ, M.;HESLOP, H. E.; KRANCE, R. A. Complement-Fixing CD45 Monoclonal Antibodies to Facilitate Stem Cell Transplantation in Mouse and Man. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 996, p. 80–88, 2003.

BYSTRYN, J. C.; RUDOLPH, J. L. Pemphigus.**The Lancet**, v. 366 (9479), p. 61–73, 2005.

CAMARGO, C. M.; AUGUSTO, D. G.; PETZL-ERLER, M. L. Differential gene expression levels might explain association of LAIR2 polymorphisms with pemphigus. **Human Genetics**, v. 135 (2), p. 233-244, 2016.

CAMPBELL, I.; REIS, V.; AOKI, V.; CUNHA, P.; HANS FILHO, G.; ALVES, G.; ROCHA, R.; FRIEDMAN, H. Pênfigo foliáceo endêmico: fogo selvagem / endemic pemphigusfoliaceous: fogo selvagem. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 76(1), p. 13-33, 2001.

CAMPBELL, I.; LABIB, R. S.;ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogoseivagem). I. Clinical features and immunopathology.**Journal of the American Academy of Dermatology**, V. 20 (4), P. 657–669, 1989.

CHO, H. Complement regulation: physiology and disease relevance. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 58 (7), p. 239–244, 2015.

CHOI, N. H.; MAZDA, T.; TOMITA, M. A serum protein SP40,40 modulates the formation of membrane attack complex of complement on erythrocytes. **Molecular Immunology**, v. 26(9), p. 835-40, 1989.

CLAYTON, A.; HARRIS, C. L.; COURT J, MASON MD, MORGAN BP. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. **European Journal of Immunology**, v. 33(2), p. 522-531, 2003.

CULTON, D. A.; QIAN, Y.; LI, N.; RUBENSTEIN, D.; AOKI, V.; FILHO, G. H.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. Advances in Pemphigus and its Endemic Pemphigus Foliaceus (FogoSelvagem) Phenotype: A Paradigm of Human Autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 31 (4), p. 311–324, 2008.

DECKERT, M.; KUBAR, J.; BERNARD, A. CD58 and CD59 molecules exhibit potentializing effects in T cell adhesion and activation. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 672–677, 1992.

DELGADO, G. J. R.; GARZA, E. V.; RAMÍREZ, N. M.; ALMAGUER, D. G. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Hematology**, v. 14(1), p. 33-37, 2009.

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; FILHO, G. H.;BORGES, P.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; LABIB, R. S.;ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, V. 20 (4), P. 657–669, 1989.

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; FILHO, G. H.;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. [2]

DONEV, R. M.; COLE, D. S.; SIVASANKAR, B.; HUGHES, T. R.; MORGAN, B. P. p53 Regulates Cellular Resistance to Complement Lysis through Enhanced Expression of CD59. **Cancer Research**, v. 66: (4), p. 2451-2458, 2006.

DZIK, J.M. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. **Acta Biochimica polonica**, vol. 57, p. 443-466, 2010.

ENSEMBL. CD59 (gene). <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000085063;r=11:33698261-33736445> Acesso em 03/2016.

FRUSIC-ZLOTKIN, M.; PERGAMENTZ, R.; MICHEL, B.; DAVID, M.; MIMOUNI, D.; BRÉGÉGÉRE, F; MILNER, Y. The interaction of pemphigus autoimmunoglobulins with epidermal cells. **Ann NY Acad Sci**, v. 1050, p. 371-79, 2005.

GORTER, A.; MERI, S. Immune evasion of tumour cells using membrane-bound complement regulatory proteins. **Immunol Today**, v. 20, p. 576–582, 1999.

GLEICHER, N.; BARAD, D. H. Gender as risk factor for autoimmune diseases. **J Autoimmun**, v. 28, p. 1–6, 2007.

HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; EATON, D. P.; MONG, S. L.; DIAZ, L. A. The cooperative group on fogo selvagem research endemic pemphigus foliaceous (fogo selvagem). **Clinical Dermatology**, v. 17, p. 225-235, 1999.

HANS-FILHO, G.; SANTOS, V.; KATAYAMA, J. H.; AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; SAMPAIO, S. A. P.; FRIEDMAN, H.; MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; EATON, D. P.; LOPEZ, A. L.; HOFFMAN, R. G.; FAIRLEY, J. A.; GIUDICE, G. J.; DIAZ, L. A. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on Amerindian reservation in Brazil. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, p. 68-75, 1996.

HARRIS, C. L.; FRASER, D. A.; MORGAN, B. P. Tailoring anti-complement therapeutics. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 1019-1026, 2002.

HERTL, M.; EMING, R.; VELDMAN, C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116 (5), p. 1159-1166, 2006.

HOCHSMANN, B., DOHNA-SCHWAKE, C., KYRIELEIS, H. A., PANNICKE, U., SCHREZENMEIER, H. Targeted therapy with eculizumab for inherited CD59 deficiency. **New Eng. J. Med**, v. 370, p. 90-92, 2014.

HOLERS, V. M. The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases. **Immunological Reviews**, v. 223, p. 300-316, 2008.

HU, W.; YU, Q.; HU, N.; BYRD, D.; AMET, T.; SHIKUMA, C. A high-affinity inhibitor of human CD59 enhances complement-mediated virolysis of HIV-1: implications for treatment of HIV-1/AIDS. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 359-368, 2010.

HUANG, Y.; QIAO, F.; ABAGYAN, R.; HAZARD, S.; TOMLINSON, S. Defining the CD59-C9 Binding Interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 27398-27404, 2006.

HUANG, Y.; FEDAROVICH, A.; TOMLINSON, S.; DAVIES, C. Crystal structure of CD59: implications for molecular recognition of the complement proteins C8 and C9 in the membrane-attack complex. **Acta Crystallography**, v. 63, p. 714–721, 2007.

ITURRY-YAMAMOTO, G.R.; PORTINHO C.P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47 (1), 2001.

JORDON, R. E. Complement Activation in pemphigus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 74, p. 357-359, 1980.

KAWANA, S.; GEOGHEGAN, W. D.; JORDON, R. E. Complement fixation by pemphigus antibody. II. Complement enhanced detachment of epidermal cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 61(3), p.517–525, 1985.

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(3), p. 464–469, 1988.

KAWANA, S; GEOGHEGAN, W. D.; JORDON, R. E.; NISHIYAMA, S. Deposition of membrane attack complex of complement in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceous skin. **The Society of Investigative Dermatology**, v. 92, p. 588-591, 1989.

KIMBERLEY, F. C.; SIVASANKAR, B.; MORGAN, B. P. Alternative roles for CD59. **Molecular Immunology**, v. 44 (1-3), p. 73–81, 2007.

KINDERLERER, A. R.; STEINBERG, R.; JOHNS, M.; HARTEN, S. K.; LIDINGTON, E. A.; HASKARD, D. O.; MAXWELL, P. H.; MASON, J. C. Statin-induced expression of CD59 on vascular endothelium in hypoxia: a potential mechanism for the anti-inflammatory actions of statins in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.8 (4), 2006.

KITAJIMA, Y.; AOYAMA, Y. A Perspective of Pemphigus from Bedside and Laboratory-Bench. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 33 (1), p. 57-66, 2007.

KORMAN, N. Pemphigus. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 18 (6), p. 1219–1238, 1988.

KORTY, P. E.; BRANDO, C.; SHEVACH, E. M. CD59 functions as a signaltransducing molecule for human T cell activation. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 4092–4098, 1991.

KRUS, U.; KING, B. C.; NAGARAJ, V.; GANDASI, N. R.; LANDER, J. S.; BUDA, P.; GARCIA-VAZ, E.; GOMEZ, M. F.; OTTOSSON-LAAKSO, E.; STORM, P.; FEX, M.; VIKMAN, P.; ZHANG, E.; BARG, S.; BLOM, A. M.; RENSTRO, E. The Complement Inhibitor CD59 Regulates Insulin Secretion by Modulating Exocytotic Events. **Cell**, v. 19, p. 883–890, 2014.

KUSNER, L. L.; KAMINSKI, H. J. The role of complement in experimental autoimmune myasthenia gravis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1274, p. 127-32, 2012.

LAPIERE, J. C.; GUITART, J.; ETTLIN, D. A.; CHEN, D. M.; AMAGAI, M.; CHAN, L. S. Preferential activation of the complement system in the lower epidermis of patients with pemphigus vulgaris. **British Journal of Dermatology**, v. 139 (5), p. 851–854, 1998.

LAW, S. K. A.; REID, K. B. M. Complement. **Oxford, Ilpress**, v. 72, 1988.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. **Methods**, v.25, p. 402-408, 2001.

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; FRIEDMAN, C. A.; MARTINS, C. R.; SANCHEZ JR, J. A.; CUNHA, P. R.; HOFFMAN, R. G.; DIAZ, L. A. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceous (fogo selvagem). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, p. 847-850, 1992.

LONGHI, M. P.; SIVASANKAR, B.; OMIDVAR, N.; MORGAN, B. P.; GALLIMORE, A. Cutting edge: murine CD59a modulates antiviral CD4+ T cell activity in a complement-independent manner. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 7098–7102, 2005.

MAHONEY, M. G.; WANG, Z.; ROTHENBERGER, K.; KOCH, P. J.; AMAGAI, M.; STANLEY, J. R. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103 (4), p. 461-468, 1999.

MALHEIROS. F., D. **Análise do perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4^{+} aplicada ao estudo da doença autoimune pênfigo foliáceo endêmico**. Tese de doutorado, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2009.

MALHEIROS, F. 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, p. 547–558, 2009.

MALHEIROS. F., D.; PANEPUCCI, R. A.; ROSELINO, A. M.; ARAÚJO, A. G.; ZAGO, M. A.; PETZL-ERLER, M. L. Genome-wide gene expression profiling reveals unsuspected molecular alterations in pemphigus foliaceus. **Immunology**, 2014.

MARCENARO, E.; AUGUGLIARO, R.; FALCO, M.; CASTRICONI, R.; PAROLINI, S.; SIVORI, S.; ROMEO, E.; MILLO, R.; MORETTA, L.; BOTTINO, C.; MORETTA, A. CD59 is physically and functionally associated with natural cytotoxicity receptors and activates human NK cell-mediated cytotoxicity. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 3367–3376, 2003.

MEYERA, N.; MISERY L. Geoepidemiologic considerations of auto-immune pemphigus. **Autoimmunity Reviews**, v. 9 (5), p. A379–A382, 2010.

MESSIAS, I. T.; SANTAMARIA, J.; RAGIOTTO, R.; DOI, M.; KAJDACSY, A. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 14, p. 51-55, 1989.

MESSIAS-REASON, I. J.; BOSCO, D. G.; NISIHARA, R. M.; JAKOBSEN, L. H.; PETZL-ERLER, M. L.; JENSENIUS, J. C. Circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 in endemic pemphigus foliaceus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 33, p. 495–497, 2008.

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

MONLEON, I.; MARTINEZ-LORENZO, M.J.; ANEL, A.; LASIERRA, P.; LARRAD, L.; PINEIRO, A.; NAVAL, J.; ALAVA, M.A. CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 1078–1087, 2000.

MULLER-EBERHARD, H. J. Molecular Organization and Function of the Complement System. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 321-347, 1988.

NADERI, S.; HOFMANN, P.; SEITER, S.; TILGEN, W.; ABKEN, H.; REINHOLD, U. CD2-mediated CD59 stimulation in keratinocytes results in secretion of IL-1alpha, IL-6, and GM-CSF: implications for the interaction of keratinocytes with intraepidermal T lymphocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 3, p. 609–614, 1999.

NEVO, Y.; BEN-ZEEV, B.; TABIB, A.; STRAUSSBERG, R.; ANIKSTER, Y.; SHORER, Z.; FATTAL-VALEVSKI, A.; TA-SHMA, A.; AHARONI, S.; RABIE, M.; ZENVIRT, S.; GOLDSHMIDT, H.; FELLIG, Y.; SHAAG, A.; MEVORACH, D.; ELPELEG, O. CD59

deficiency is associated with chronic hemolysis and childhood relapsing immune-mediated polyneuropathy. **Blood**, v. 121, p. 129-135, 2013.

NISIHARA, R. M.; DE BEM, R. S.; HAUSBERGER, R.; ROXO, V. S.; PAVONI, D. P.; PETZL-ERLER, M. L.; MESSIAS-REASON, I. J. Prevalence of autoantibodies in patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Archives of Dermatological research**, v. 295, p. 133-137, 2003.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of Complement Activation and Regulation. **Seminars in Nephrology**, v. 33 (6), p. 479–492, 2013.

OLIVEIRA, L. C.; BOLDT, A. B. W. **Estudo de associação entre polimorfismos e níveis séricos do receptor 1 do complemento e o pênfigo foliáceo.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

OLIVEIRA-JR, J. V. **Perfil Clínico e imunológico dos pênfigos vulgar e foliáceo com envolvimento umbilical**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OMIDVAR, N.; WANG, E.C.; BRENNAN, P.; LONGHI, M. P.; SMITH, R. A.; MORGAN, B. P. Expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored CD59 on target cells enhances human NK cell-mediated cytotoxicity. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 2915–2923, 2006.

OMIM. CD59. http://omim.org/entry/107271. Acesso em 29/09/2014.

PAVONI, D. P.; ROXO, V. M. M. S.; MARQUART FILHO, A.; PETZL-ERLER, M. L. Dissecting the associations of endemic Pemphigus Foliaceus (FogoSelvagem) 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. M. S.; 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.

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 133–149, 2011.

PETRANKA, J. G.; FLEENOR, D. E.; SYKES, K.;KAUFMAN, R. E.; ROSSE, W. F. Structure of the CD59-encoding gene: Further evidence of a relationship to murine lymphocyte antigen

Ly-6 protein (human late complement inhibitor gene). **Medical Science**, v. 89, p. 7876-7879, 1992.

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.

PINHEIRO, F. G.; FRANCO, A. M. R. Pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem) em indígena Yanomami no Município de São Gabriel da Cachoeira, Estado do Amazonas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, p. 53-56, 2014.

PROBST, C.M.; BOMPEIXE, E.P.; PEREIRA, N.F.; DE O DALALIO M.M.; VISENTAINER, J.E.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L. HLA polymorphisms and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Human Biology**, v. 72, p. 597-617, 2000.

PU, J. J.; BRODSKY, R. A. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria from Bench to Bedside. **Clin Transl Sci**, v. 4(3), p. 219–224, 2011.

QIAN, Y.; JEONG, J. S.; MALDONADO, M.; VALENZUELA, J. G.; GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; EVANGELISTA, F.;QAQISH, B.; AOKI, V. HANS JR., G.; RIVITTI, E. A.; EATON, D.; DIAZ, L. A. Cutting Edge: Brazilian Pemphigus Foliaceus Anti-Desmoglein 1 Autoantibodies Cross-React with Sand Fly Salivary LJM11 Antigen. **The Journal of Immunology**, v. 189 (4), p. 1535-1539, 2012.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11 (9), p. 785-797, 2010.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. **Journal of Immunology**, v. 190(8), p. 3831-3838, 2013.

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

RUIZ-ARGÜELLES, A. A.; LLORENTE, L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, p. 155–161, 2007.

SAGI, L.;SHERER, Y.; TRAU, H.; SHOENFELD, Y. Pemphigus and infectious agents. **Autoimmunity Reviews**, v. 8 (1), p. 33–35, 2008.

SINHA, A. A. The Genetics of Pemphigus. **Dermatologic Clinics**, v. 29 (3), p. 381–391, 2011.

SOOD, R.; ZEHNDER, J. L.; DRUZIN, M. L.; BROWN, P. O. Gene expression patterns in human placenta. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 103 (14), p. 5478–5483, 2006.

SPEAR, G. T.; LURAIN, N. S.; PARKER, C. J.; GHASSEMI, M.; PAYNE, G. H.; SAIFUDDIN, M. Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses: human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). **Journal of Immunology**, v. 155, p. 4376-4381, 1995.

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**, v. 251 (5000), p. 1451-1455, 1991.

UTIYAMA, S. R. R.; MESSIAS-REASONII, I. T. M.; KOTZE, L. M. S. O sistema complemento nas doenças: genética e patogenia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.44 (4), 2004.

UZAWA, A.; MORI, M.; UCHIDA, T.; MASUDA, H.; OHTANI, R.; KUWABARA, S. Increased levels of CSF CD59 in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 30;453, p.131-3, 2016.

VAN DEN BERG, C. W.; CINEK, T.; HALLETT, M. B.; HOREJSI, V.; MORGAN, B. P. Exogenous glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD59 associates with kinases in membrane clusters on U937 cells and becomes Ca(2+)-signaling competent. **Journal of Cell Biology**, v. 131, p. 669–677, 1995.

WARREN, S. J. P.; LIN, M. S.; GIUDICE, G. J.; HOFFMANN, R. G.; HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; SANTOS, V.; DIAZ, L. A. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 26-30, 2000.

WALPORT, M. J. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1140-1144, 2001.

XIA, P.; JORDON, R. E.; GEOGHEGAN, W. D. Complement fixation by pemphigus antibody. V. Assembly of the membrane attack complex on cultured human keratinocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82 (6), p. 1939–1947, 1988.

YAMAMOTO, T.; NAKANE, T.; DOI, S.; OSAKI, T. Lipopolysaccharide signal transduction in oral keratinocytes—involvement of CD59 but not CD14. **Cell Signal**, v. 15, p. 861–869, 2003.

YANG, L. B.; LI, R.; MERI, S.; ROGERS, J.; SHEN, Y. Deficiency of Complement Defense Protein CD59 May Contribute to Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 7505-7509, 2000.

APÊNDICE

Tabela 1. SNPs investigados de *CD59* e frequências nas populações

SNP	Região	Localização	Região no mRNA	MAF*	MAF EUR	MAF AFR	MAF AMER	MAF ASI
rs861256 *A>G*	Intron 3	*11:*33725787	Intron 2	G = 42%	37%	35%	54%	54%
rs831625 *C>G*	Intron 3	*11:*33724890	Intron 2	G = 32%	38%	7%	51%	44%
rs831629 *C>T*	Intron 3	*11:*33723118	Intron 2	T = 39%	38%	30%	53%	51%
rs704701 *C>A*	Intron 5	*11:*33722133	Intron 3	C = 41%	28%	52%	25%	40%
rs1047581 *A>G*	3' UTR	*11:*33703446	3' UTR	G = 21%	34%	20%	20%	10%
rs704697 *A>G*	3' UTR	*11:* 33703234	3' UTR	A = 49%	41%	54%	60%	46%

LEGENDA: a identificação dos SNPs está de acordo com o SNP database (NCBI), e as frequências populacionais estão de acordo com o Ensembl database. O primeiro alelo é o ancestral e o segundo, o alelo mutante. A localização é representada pelo número do cromossomo e número de pares de bases. MAF – Frequência do Alelo menos comum; *refere-se ao alelo menos comum na população total (não necessariamente o mutante), variando entre as populações europeias (EUR), africana (AFR), ameríndias (AMER) e asiáticas (ASI).

Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas observadas

	EURO-BRASILEIROS					AFRO- BRASILEIROS					TOTAL				
	Controles		Pacientes		p	Controles		Pacientes		p	Controles		Pacientes		p
rs861256	n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%	
G	98	33.8	82	40.2	0.0224 (/A)* OR=1.84	64	45.7	50	45.5	-	162	37.7	132	42	-
A	192	66.2	122	59.8	-	76	54.3	60	54.5	-	268	62.3	182	58	-
G+	83	57.2	69	67.6	0.0038* OR=3.12	50	71.4	46	83.6	0.0031* OR=8.78	133	61.9	115	73.2	0.0258 OR=1.69
A+	130	89.7	89	87.3	-	56	80	51	92.7	-	186	86.5	140	89.2	-
AA	62	42.8	33	32.4	-	20	28.6	9	16.4	-	82	38.1	42	26.8	-
AG	68	46.9	56	54.9	0.0046 (/AA)* OR=3.19	36	51.4	42	76.4	0.008 (/AA)* OR=7	104	48.4	98	62.4	0.0112 (/AA) OR=1.68
GG	15	10.3	13	12.7	-	14	20	4	7.3	-	29	13.5	17	10.8	-
rs831625															
C	193	66.6	125	61.3	-	86	61.4	76	69.1	-	279	64.9	201	64	-
G	97	33.4	79	38.7	-	54	38.6	34	30.9	-	151	35.1	113	36	-
C+	129	89	86	84.3	-	56	80	49	89.1	-	185	86	135	86	-
G+	81	55.9	63	61.8	0.0523* OR=2.11	40	57.1	28	50.9	-	121	56.3	91	58	-

CC	64	44.1	39	38.2	-	30	42.9	27	49.1	-	94	43.7	66	42	-
CG	65	44.8	47	46.1	-	26	37.1	22	40	-	91	42.3	69	43.9	-
GG	16	11	16	15.7	-	14	20	6	10.9	-	30	14	22	14	-
rs831629															
T	96	33.1	70	34.3	-	59	42.1	38	34.5	-	155	36	108	34.4	-
C	194	66.9	134	65.7	-	81	57.9	72	65.5	-	275	64	206	65.6	-
T+	81	55.9	56	54.9	-	42	60	35	63.6	-	123	57.2	91	58	-
C+	130	89.7	88	86.3	-	53	75.7	52	94.5	0.0058 OR=5.56	183	85.1	140	89.2	-
TT	15	10.3	14	13.7	-	17	24.3	3	5.5	0.0486 (/CC) OR=0.25	32	14.9	17	10.8	-
TC	66	45.5	42	41.2	-	25	35.7	32	58.2	0.0016 (/TT) OR=7.25	91	42.3	74	47.1	-
CC	64	44.1	46	45.1	-	28	40	20	36.4	-	92	42.8	66	42	-
rs704701															
C	103	35.5	65	31.9	-	41	29.3	46	41.8	-	144	33.5	111	35.4	-
A	187	64.5	139	68.1	-	99	70.7	64	58.2	0.0451 (/C) OR=0.58	286	66.5	203	64.6	-
C+	84	57.9	49	48	-	34	48.6	38	69.1	0.0285 OR=2.37	118	54.9	87	55.4	-
A+	126	86.9	86	84.3	-	63	90	47	85.5	-	189	87.9	133	84.7	-
CC	19	13.1	16	15.7	-	7	10	8	14.5	-	26	12.1	24	15.3	-
CA	65	44.8	33	32.4	-	27	38.6	30	54.5	0.035 (/AA) OR=2.35	92	42.8	63	40.1	-
AA	61	42.1	53	52	-	36	51.4	17	30.9	-	97	45.1	70	44.6	-
rs1047581															
G	100	34.5	64	31.4	-	34	24.3	31	28.2	-	134	31.2	95	30.3	-
A	190	65.5	140	68.6	-	106	75.7	79	71.8	-	296	68.8	219	69.7	-
G+	85	58.6	52	51	-	28	40	25	45.5	-	113	52.6	77	49	-

A+	130	89.7	90	88.2	-	64	91.4	49	89.1	-	194	90.2	139	88.5	-
AA	60	41.4	50	49	-	42	60	30	54.5	-	102	47.4	80	51	-
AG	70	48.3	40	39.2	-	22	31.4	19	34.5	-	92	42.8	59	37.6	-
GG	15	10.3	12	11.8	-	6	8.6	6	10.9	-	21	9.8	18	11.5	-
rs704697															
G	185	63.8	118	57.8	0.0442 (/A)* OR=0.59	72	51.4	66	60	-	257	59.8	184	58.6	-
A	105	36.2	86	42.2	-	68	48.6	44	40	-	173	40.2	130	41.4	-
G+	129	89	85	83.3	-	51	72.9	47	85.5	-	180	83.7	132	84.1	-
A+	89	61.4	69	67.6	0.0465* OR=2.22	49	70	36	65.5	-	138	64.2	105	66.9	-
AA	16	11	17	16.7	-	19	27.1	8	14.5	-	35	16.3	25	15.9	-
AG	73	50.3	52	51	-	30	42.9	28	50.9	-	103	47.9	80	51	-
GG	56	38.6	33	32.4	-	21	30	19	34.5	-	77	35.8	52	33.1	-

LEGENDA: Frequências alélicas e genotípicas observadas em controles e pacientes euro e afro-brasileiros. Os valores de p estão sendo mostrados apenas para as diferenças significativas ($p < 0.05$) ou tendências de associação. Os valores de OR e intervalos de confiança a 95% se encontram na tabela 4 do artigo.

* Associação encontrada apenas em mulheres.

ANEXOS

ANEXO 1 - FICHA DE AVERIGUAÇÃO - PÊNFIGO

CÓDIGO DO INDIVÍDUO	Nº DO PRONTUÁRIO	LOCAL	DATA DA AVERIGUAÇÃO	AVERIGUADOR

Material coletado

Biópsia de pele. (1) Sim (2) Não.
Sangue periférico: (1) Sim (2) Não.

Volume total_____ml.
Volume em heparina_____ml.

1) IDENTIFICAÇÃO

Nome:_____
Sexo: (1) Masculino (2) Feminino
Estado civil: (1) solteiro(a) (4) divorciado(a)
(2) casado(a) (5) Outros: _____
(3) viúvo(a)
Data de nascimento:_____/_____/_____Município:_____UF:_____
Endereço:_____CEP:_____
Telefone: (_____) _____
Município:_____UF:_____Próximo a: _____
Nome, telefone e endereço de pessoa para contato:
_____

Municípios onde residiu:

Município	Tempo de residência	Exposição a (usar os códigos abaixo e especificar para cada exposição):	Obs.

Código: (1) Animais, (2) Insetos, (3) Lavouras, (4) Rios

Grupo étnico:

(1) Branco (5) Negro
(2) Mulato-claro (6) Indígena
(3) Mulato-médio (7) Oriental
(4) Mulato-escuro (8) Branco brasileiro

Obs.:_____
_____
_____

Escolaridade:_____anos completos de estudo
Grau de instrução: (1) Analfabeto (5) Médio completo
(2) Fundamental incompleto (6) Superior incompleto

(3) Fundamental completo (7) Superior completo
(4) Médio incompleto (8) Pós-graduação

História ocupacional:

Emprego/Ocupação	Período	Obs.

2) EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS (considerar: agrotóxicos, tintas, solventes...)

Agente	Período	Frequência (vezes por semana)	Obs.

Tipo de habitação: (1) madeira (2) alvenaria (3) mista (4) Outros: _____
Nº de cômodos: _____
Nº banheiros: _____
Saneamento básico: (1) Sim (2) Não
Energia elétrica: (1) Sim (2) Não
Nº de pessoas que vivem na habitação: _____

3) HISTÓRIA FAMILIAR

Nome do pai: _____
Município de nascimento:_____UF: _____
Ascendência do pai: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: _____
Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Nome da mãe: _____
Município de nascimento:_____UF: _____
Ascendência da mãe: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: _____
Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Pais consanguíneos (considerar mesmo se primos distantes)? (1) Sim (2) Não (se sim, descrever com heredograma, no verso)
Número de irmãos - total: _____
Número de irmãos vivos: _____
Todos filhos dos mesmos pais? (1) Sim (2) Não Ordem de nascimento dos irmãos:
_____
_____

Quantas vezes engravidou / sua esposa engravidou? _____
Quantos filhos nasceram vivos? _____
Quantos filhos nasceram mortos? _ Algum aborto (perca)? _____

Alguém na família tem a mesma doença? (1) Sim (2) Não
Nome e grau de parentesco: _____

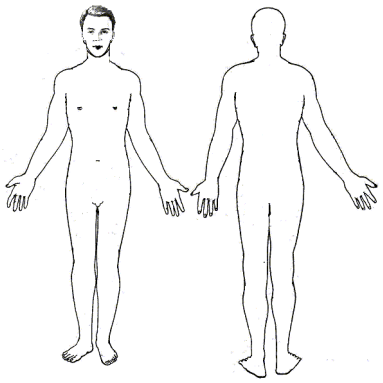
Caso haja algum caso, fazer o heredograma dos familiares (no verso)
A doença foi semelhante à sua? (1) Sim (2) Não

Caso não seja semelhante, especificar abaixo a diferença:

_____
_____
_____

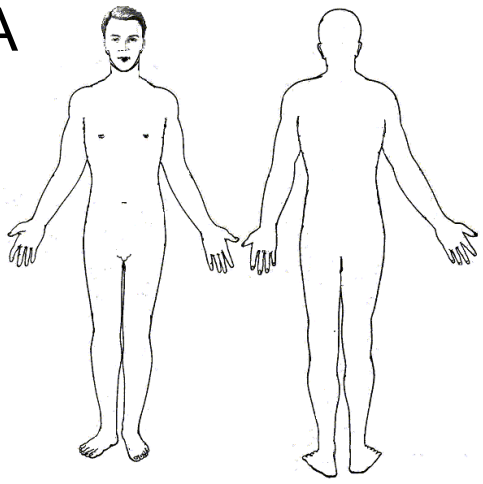
4) ASPECTOS CLÍNICOS

LESÕES
Apresenta lesões no momento da coleta? (1) Sim (2) Não
Região do corpo: marcar os lugares em que há lesões ativas.

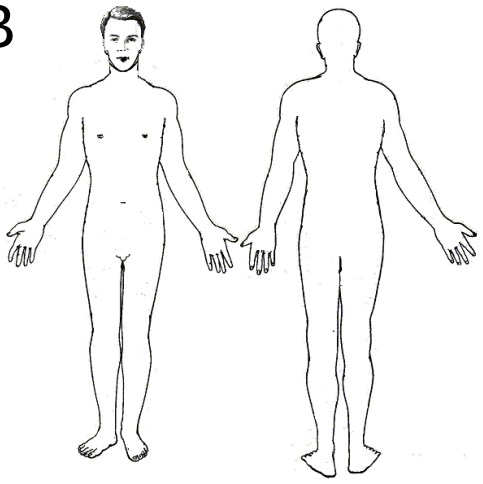


EVOLUÇÃO DAS LESÕES
Município em que apareceu a lesão primária: _____
Idade:_____Ano:_____Mês do ano em que apareceu: _____
A lesão se disseminou? (1) Sim (2) Não
Utilize os esquemas abaixo para mostrar: **A**) lesão primária; **B**) evolução em ordem crescente (ex: 1 marca o lugar onde surgiram novas lesões, 2 o segundo e assim sucessivamente). Utilizar a mesma chave numérica na tabela abaixo.

A



B



Local (usar número colocado no esquema acima)	Tempo após lesão primária
1	
2	
3	

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

Base do diagnóstico: (1) Informações clínicas (2) Histopatológico (3) Imunohistoquímica

Pênfigo Vulgar ( ) Pênfigo Foliáceo ( ).

Local do diagnóstico - Instiuição:_____Município:_____UF: _____

Informações adicionais sobre diagnóstico:
(1) Informações clínicas: _____
_____
(2) Histopatológico: _____
_____
(3) Imunohistoquímica: _____
_____

TITULAÇÃO DE ANTICORPOS

Anticorpo	Data	Título

TRATAMENTO ATUAL DE PÊNFIGO

1- Prednisona ( ) Dose_____Posologia_____Início_____
2- Azatioprina ( ) Dose_____Posologia_____Início_____
3-_____Dose_____Posologia_____Início _____

TRATAMENTOS ANTERIORES DE PÊNFIGO

Medicamento	Dose	Via de administração (usar código abaixo)	Posologia	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)	Melhora das lesões? (1) Sim (2) Não

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

Houve interrupção do tratamento? (1) Sim (2) Não

Interrupção no tratamento:
1- Prednisona ( ) Sim ( ) Não Tempo:_____Motivo:_____
2- Azatioprina ( ) Sim ( ) Não Tempo:_____Motivo: _____
3-_____( ) Sim ( ) Não Tempo:_____Motivo: _____

OUTROS MEDICAMENTOS

MEDICAMENTO	DOSE	VIA DE ADMINISTRAÇÃO (usar código abaixo)	POSOLOGIA	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

OUTRAS DOENÇAS:

DOENÇA	DATA DE DIAGNÓSTICO	DATA DE CURA	TRATAMENTO

HÁBITOS ALIMENTARES

Costuma ingerir (marcar todos que se aplica):

Alimento	Frequência	Quantidade	OBS
(1) manga			
(2) alho			
(3) alho-poró			
(4) cebola			
(5) água de poço/rio			

ANEXO 2- FICHA DE AVERIGUAÇÃO - CONTROLES

CÓDIGO DO INDIVÍDUO	LOCAL	DATA DA AVERIGUAÇÃO	AVERIGUADOR

Material coletado

Biópsia de pele. (1) Sim (2) Não.
Sangue periférico: (1) Sim (2) Não.

Volume total_____ml.
Volume em heparina_____ml.

1) IDENTIFICAÇÃO

Nome:_____
Sexo: (1) Masculino (2) Feminino
Estado civil: (1) solteiro(a) (4) divorciado(a)
(2) casado(a) (5) Outros: _____
(3) viúvo(a)
Data de nascimento:_____/_____/_____Município:_____UF:_____
Endereço:_____CEP:_____
Telefone: (_____) _____
Município:_____UF:_____Próximo a: _____
Nome, telefone e endereço de pessoa para contato:
_____
_____

Municípios onde residiu:

Município	Tempo de residência	Exposição a (usar os códigos abaixo e especificar para cada exposição):	Obs.

Código: (1) Animais, (2) Insetos, (3) Lavouras, (4) Rios

Grupo étnico:

(1) Branco (5) Negro

Obs.:_____

(2) Mulato-claro (6) Indígena _____
(3) Mulato-médio (7) Oriental _____
(4) Mulato-escuro (8) Branco brasileiro

Escolaridade: _____ anos completos de estudo

Grau de instrução: (1) Analfabeto (5) Médio completo
(2) Fundamental incompleto (6) Superior incompleto
(3) Fundamental completo (7) Superior completo
(4) Médio incompleto (8) Pós-graduação

História ocupacional:

Emprego/Ocupação	Período	OBS

Exposição a agentes químicos (considerar: agrotóxicos, tintas, solventes...)

Agente	Período	Frequência (vezes por semana)	Obs.

Tipo de habitação: (1) madeira (2) alvenaria (3) mista (4) Outros: _____ Nº de cômodos: _____
Nº banheiros: _____ Saneamento básico: (1) Sim (2) Não
Energia elétrica: (1) Sim (2) Não
Nº de pessoas que vivem na habitação: _____

2) HISTÓRIA FAMILIAR

Nome do pai: _____
Município de nascimento: _____ UF: _____
Ascendência do pai: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: _____ Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Nome da mãe: _____
Município de nascimento: _____ UF: _____
Ascendência da mãe: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: _____
Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Pais consanguíneos (considerar mesmo se primos distantes)? (1) Sim (2) Não (se sim, descrever com heredograma, no verso)
Número de irmãos - total: _____
Número de irmãos vivos: _____

Todos filhos dos mesmos pais? (1) Sim (2) Não Ordem de nascimento dos irmãos:

_____
_____
_____

Quantas vezes engravidou / sua esposa engravidou? _____
Quantos filhos nasceram vivos? _____
Quantos filhos nasceram mortos? _ Algum aborto (perca)? _____

Alguém na família tem pênfigo? (1) Sim (2) Não
Nome e grau de parentesco: _____
Caso haja algum caso, fazer o heredograma dos familiares (no verso)

3) MEDICAMENTOS

Toma algum medicamento? (1) Sim (2) Não

MEDICAMENTO	DOSE	VIA DE ADMINISTRAÇÃO (usar código abaixo)	POSOLOGIA	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

4) DOENÇAS

Tem ou teve alguma doença? (1) Sim (2) Não

DOENÇA	DATA DE DIAGNÓSTICO	DATA DE CURA	TRATAMENTO

5) HÁBITOS ALIMENTARES

Costuma ingerir (marcar todos que se aplica):

Alimento	Frequência	Quantidade	OBS
(1) manga			
(2) alho			

(3) alho-poró			
(4) cebola			
(5) água de poço/rio			

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO DOS ASPECTOS GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS DO PÊNFIGO

Este é um convite para você participar voluntariamente do projeto de pesquisa GENES E SUAS VARIAÇÕES: ANÁLISE MOLECULAR, EVOLUTIVA E FUNCIONAL, EM POPULAÇÕES E EM DOENÇAS. Por favor, leia com atenção as informações abaixo antes de dar ou não seu consentimento para participar deste estudo. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com quem você está conversando neste momento.

- **OBJETIVO DO ESTUDO**

O objetivo desse estudo é conhecer porque certas pessoas contraem o pênfigo enquanto outras aparentemente são resistentes ao desenvolvimento dessa doença. A predisposição ao pênfigo depende de vários fatores. Alguns desses fatores são do ambiente no qual a pessoa vive e de seus hábitos alimentares ou medicamentos. Outros são genéticos, hereditários. Entretanto, os fatores de predisposição ainda são pouco conhecidos. Esse trabalho de pesquisa científica contribuirá para esclarecer quais os fatores genéticos (hereditários) que tornam a pessoa mais, ou menos, predisposta à doença e como isso acontece. Os resultados poderão auxiliar para a prevenção, tratamento e cura da doença, no futuro.

- **PROCEDIMENTOS**

Se você participar deste estudo, será colhida uma amostra de seu sangue (cerca de 50 ml, ou seja, correspondente ao volume de um copo de cafezinho) e/ou uma amostra da pele, do mesmo tipo que é colhida para os exames de laboratório solicitados pelo seu médico. Essa amostra de pele (biópsia) será obtida pelos médicos responsáveis. A amostra de sangue será dividida em três partes que servirão para a obtenção de DNA (10 ml), de RNA (15 ml) e de células mononucleares (PBMC) (25 ml). Seu médico ou o prontuário médico será consultado, para confirmação do diagnóstico e tratamento. Além disso, faremos algumas perguntas sobre a sua origem e a origem de seus ancestrais, assim como sobre os seus hábitos e condições de vida. Você pode recusar-se a responder a qualquer das perguntas, se assim desejar.

- **RISCOS**

Os riscos envolvidos na execução do estudo são raros e transitórios. A coleta da amostra de sangue e, se houver, a coleta da amostra de pele, poderão causar desconforto e, raramente, poderão causar alguma outra complicação entre as quais a mais comum é a formação de hematoma. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado médico para justificar a sua falta. Se houverem danos decorrentes da pesquisa, você será devidamente indenizado.

- **BENEFÍCIOS**

Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para você. Porém, o conhecimento adquirido através deste estudo poderá auxiliar na compreensão das causas da doença. Isso poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos mais eficientes de prevenção e tratamento, com menos efeitos indesejados.

- **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

A sua participação neste estudo é voluntária. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você.

- **ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS**

No caso em que você concorde, as amostras biológicas serão armazenadas no Biorrepositório de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana, na Universidade Federal do Paraná, pelo período necessário para realização do projeto de pesquisa. Caso necessário e se você concordar, este período será prorrogado após a sua aprovação e aprovação por parte do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e o material poderá permanecer armazenado para pesquisas futuras se em conformidade com as normas do CNS (Art. 1º-12 da RESOLUÇÃO CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011).

( ) Sim, concordo com que o material biológico coletado seja depositado no Biorrepositório acima citado para que seja utilizado em pesquisas previamente aprovadas pelo CEP e CONEP (quando for o caso).
( ) Não, não desejo que o material biológico seja armazenado e utilizado em futuras pesquisas.

- **ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS**

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo.

- **GARANTIA DE SIGILO E PRIVACIDADE**

A sua identificação e todos seus dados pessoais, clínicos, de exames laboratoriais e de tratamentos serão mantidos em sigilo. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

- **ACESSO AOS RESULTADOS**

Se você desejar acompanhar os estudos, estaremos à disposição no Departamento de Genética da UFPR ou nos telefones que se encontra neste documento.

- **EQUIPE DE PESQUISADORES**

Os pesquisadores envolvidos nesse projeto são:
Pesquisador responsável: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler - Departamento de Genética, UFPR.
Colaboradores: Dra. Luiza Guilherme Guglielmi (USP - SP); Dra. Ana Maria Roselino e Dr. Marco Antônio Zago (FMRP-USP); Dr. Alfredo Marquardt Filho (Hospital Adventista do Pênfigo); Dra. Noemi Farah Pereira (Hospital de Clínicas, UFPR); Dra. Luiza Tamie Tsuneto (UEM); Dr. Eduardo Rocha Amazonas de Almeida (UFPR); Dra. Márcia Holsbach Beltrame (UFPR); Dr. Danillo Gardenal Augusto; Dra. Danielle Malheiros Ferreira (UP); Dra. Karin Braun-Prado (UFPR); Alunos do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR: Reginaldo Vieira de Sene, Liana Alves de Oliveira, Gabriel Adelman Cipolla, Sara Cristina Lobo Alves e Sheyla Mayumi Kuniwake; Alunos de graduação da UFPR: Eleonora Paulini, Pedro Henrique Costa Cruz e Simone Lenis Fachin.

Número de telefones: (+41) 3361-1746 e 3361-1724
(+41) 9741-9969 (Dr. Eduardo Amazonas de Almeida)

Diante do exposto acima eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre os objetivos do presente estudo, sobre os desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que poderão dele resultar. Concedo meu acordo de participação de livre e espontânea vontade. Foi-me assegurado o direito de abandonar o estudo a qualquer momento, se eu assim o desejar. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

_____, ____ de _____ de _____
local data

Assinaturas

_____	_____
Voluntário	Pesquisador
RG	RG

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é assinado em duas vias, uma para você e outra que será arquivada pela pesquisadora responsável.
Este Termo de Consentimento foi revisado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital

de Clínicas da UFPR. Este Comitê é responsável pela análise das pesquisas e defesa dos interesses dos seus sujeitos, em sua integridade e dignidade. Dessa forma, contribui para o desenvolvimento da pesquisa respeitando os princípios éticos preconizados pela Resolução CNS 196/96 e suas complementares.
Endereço: Bloco Central – Térreo – Hall da Direção, HC-UFPR, Curitiba, PR.
Horário de atendimento: das 08:00 h às 17:00 h.
Fone/Fax: (41) 3360 1041

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: GENES E SUAS VARIAÇÕES: ANÁLISE MOLECULAR, EVOLUTIVA E FUNCIONAL, EM POPULAÇÕES E EM DOENÇAS

Pesquisador: Maria Luiza Petzl Erler

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);
Estudos com populações indígenas;

Versão: 5

CAAE: 02727412.4.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Fundação Araucária
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO
FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 505.988

Data da Relatoria: 18/12/2013

Apresentação do Projeto:

Introdução:

GENÉTICA DE POPULAÇÕES: O estudo da diversidade genética das populações tem uma série de aplicações, auxiliando no entendimento da evolução humana, da história demográfica das populações, da ação de fatores evolutivos em sequências genômicas e do significado funcional, normal e patológico da diversidade genética humana. As frequências alélicas podem diferir entre populações - alelos muito comuns em um grupo podem ser raros, ou mesmo ausentes, em outro, especialmente quando as populações analisadas são relativamente isoladas. O componente genético de predisposição às doenças complexas é constituído, principalmente, por variantes (polimorfismos e haplótipos) comuns e não deletérias na população. Uma vez que as frequências destas variantes podem diferir entre populações é necessário conhecer a sua distribuição para se compreender as causas das doenças complexas. A população brasileira é de origem heterogênea. O estudo de polimorfismos genéticos pode auxiliar na compreensão da composição da população brasileira ao estimar a contribuição de populações ancestrais. Se explorado de forma adequada, o

conhecimento da diversidade das populações brasileiras acrescentará informações importantes para a compreensão das causas de doenças complexas e do impacto populacional das associações encontradas. Dentro da população brasileira, a caracterização genética de populações indígenas é particularmente informativa, pois são populações isoladas, com fluxo gênico recente e bem menos intenso que em populações urbanas. Aliados a abordagens arqueológicas e linguísticas, entre outras, estudos genéticos de populações ameríndias levaram à elaboração de hipóteses sobre o povoamento das Américas. PÊNFIGO: O termo pênfigo designa um conjunto de doenças autoimunes da epiderme. Manifestam-se por bolhas intraepidérmicas e, histologicamente, caracterizam-se pela acantólise. As principais formas são o pênfigo vulgar e o pênfigo foliáceo (PF). Dependendo do grau de comprometimento da epiderme, o pênfigo pode ser fatal. Na maioria dos pacientes, a doença pode ser controlada através de tratamento imunossupressor o qual, entretanto, é pouco específico e apresenta efeitos indesejados que podem ser bastante graves. As causas do pênfigo ainda são desconhecidas. Sabe-se, entretanto, que é uma doença multifatorial complexa. As doenças complexas (doenças autoimunes, degenerativas, alergias, câncer, entre outras) têm um grande impacto sobre a morbidade e mortalidade da população. Resultam, em sua maioria, de um processo dependente de múltiplos fatores, entre os quais vários genes, fenômenos epigenéticos e fatores ambientais. Em conseqüência do desconhecimento das causas, quase sempre, a prevenção é dificultada e o tratamento volta-se à minimização ou eliminação de sintomas, ficando a doença sob controle, porém não curada. A identificação dos fatores que contribuem para a gênese das doenças multifatoriais constitui uma das áreas de maior interesse para a medicina e contribuirá para a identificação de novos alvos terapêuticos e à elaboração de estratégias mais específicas e eficazes de prevenção, diagnóstico, tratamento e cura. As várias formas de pênfigo são encontradas de forma esporádica em todo o mundo, entretanto, o PF ocorre também na forma endêmica, com elevada incidência principalmente em certas regiões do Brasil, mas também na Colômbia e na Tunísia. Em algumas populações brasileiras, a prevalência do pênfigo é próxima a 3%, como na população indígena Terena, no estado do Mato Grosso do Sul. A forma endêmica difere da forma esporádica apenas pelas suas características epidemiológicas. São poucos os estudos sobre o componente genético de susceptibilidade ao pênfigo. Pela execução do projeto e por meio de diferentes abordagens, espera -se contribuir para uma melhor compreensão da patogênese de doenças autoimunes, colaborando para o desenvolvimento de terapias mais efetivas e específicas.

Hipótese: Os estudos populacionais e evolutivos são exploratórios. Apesar disso, será testada a

hipótese de que as frequências de variantes polimórficas e haplotípicas de genes candidatos quanto a participação na patogênese de doenças complexas variam entre as populações investigadas ou dentro destas populações. O conhecimento desta diversidade permitirá avaliar o impacto populacional das associações com doenças, que pode ser relevante para ações de saúde pública. Os estudos de associação baseiam-se na hipótese de que as frequências de polimorfismos nos genes candidatos variam entre as populações analisadas (ex. pacientes e controles). Algumas análises de expressão testam a hipótese de que a susceptibilidade às doenças varia de acordo com a expressão dos genes e moléculas associados. Outras testam a hipótese de que a expressão de genes e de seus produtos se altera na doença ou em consequência da doença. Os testes in vitro testam a hipótese de que a presença de anticorpos terapêuticos ou de compostos bioativos afeta a expressão de genes potencialmente associados às doenças complexas. Portanto, os resultados esperados contribuirão para a compreensão dos fatores genéticos implicados na patogênese de doenças complexas e ajudarão a desenhar tratamentos mais específicos e eficientes.

Metodologia: As principais metodologias a serem aplicadas para a execução do projeto em questão são: 1. GENÓTIPAGEM. Métodos: SSP (reação de amplificação específica para variantes alélicas), PCR-SSOP (reação de polimerização em cadeia seguida de hibridação com oligonucleotídeos sonda específicos) e PCRRFLP (reação de polimerização em cadeia seguida de análise de comprimento de fragmentos de restrição). Para SSP e PCR-SSOP serão utilizados oligonucleotídeos e sondas disponíveis na literatura ou projetados pela equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH). Serão projetados oligonucleotídeos adicionais à medida que novos genes ou alelos forem descritos. A hibridação será realizada com sondas marcadas com biotina e a visualização será por revelação colorimétrica. No PCR-RFLP as sequências de interesse amplificadas e digeridas com endonucleases serão fracionadas em gel de agarose ou poliacrilamida, para polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e de inserção/deleção (indel). 2. SEQUENCIAMENTO. Será feito a partir dos produtos de PCR. Em caso de ambiguidade, poderá ser feita clonagem dos produtos de PCR, antes do sequenciamento. Os oligonucleotídeos iniciadores para as reações de PCR e também para as reações de sequenciamento são em geral projetados pela equipe do LGMH, usando o banco de dados NCBI, e o programa Oligo Analyzer 3.0. Os produtos de PCR serão purificados com polietilenoglicol (PEG), etanol, baixa temperatura e centrifugações, ou com enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão. Será utilizado sequenciador MegaBace 1000, ABI 3130 ou ABI 3500. 3. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA. O perfil

de expressão gênica global em nível de RNA e de proteína será analisado em amostras de tecido lesionado e não-lesionado de pacientes e em tecido de indivíduoscontrole com o auxílio de lâminas de microarranjos comerciais contendo aproximadamente 50.000 sondas representativas de genes humanos. A validação dos resultados será feita por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) com sondas TaqMan disponíveis comercialmente. Para a análise da expressão de genes específicos, cuja associação com o pênfigo foi previamente demonstrada, se empregarão amostras previamente genotipadas de indivíduos não afetados. Serão analisados por qPCR os RNA de indivíduos com diferentes genótipos para polimorfismos de interesse. A expressão proteica será analisada por citometria. Poderá também ser empregada análise por Western Blot. 4. ANÁLISE CELULAR IN VITRO. Para analisar in vitro as diferenças do padrão de proliferação ou do efeito citotóxico de sub-populações de leucócitos, serão utilizadas células obtidas de sangue periférico ou de biópsias de tecido lesionado e não-lesionado de pacientes e controles. As linhagens celulares de linfócitos T das lesões serão expandidas com fitohemaglutinina (PHA-P) em meio de cultura DMEM completo contendo IL-2, IL-7 e IL- 15, em presença de células alimentadoras irradiadas a 5000 rads. Após expansão das linhagens por aproximadamente 15 dias, serão estabelecidos clones de linfócitos T através da técnica de diluição limitante. A obtenção de células mononucleares do sangue periférico será realizada através do método de separação Ficoll -Hypaque. O isolamento de um tipo celular específico será realizado com utilização de anticorpos para marcadores de membrana. As células poderão ser congeladas e conservadas em nitrogênio líquido para posterior análise e possível estabelecimento de clones. A avaliação do efeito in vitro de anticorpos terapêuticos e substâncias bioativas sobre células (PBMC de pacientes e linhagens celulares) será feita por comparação dos níveis relativos de proteínas e RNA codificados por genes indicadores. Os níveis das proteínas serão estimados por citometria de fluxo e dos RNAm por qPCR. Critérios de Inclusão/ Exclusão: Inclusão: Critérios para inclusão dos indivíduos controle para o estudo do pênfigo e para estudos de genética de populações: 1. Estar livre de doenças que afetam o sistema imunológico; 2. Estar livre de doenças para as quais haja evidência de um componente genético; 3. Não receber tratamento que possa afetar as respostas imunes; 4. Ser voluntário para participar do estudo. Critérios para inclusão dos pacientes de pênfigo: 1. Ter diagnóstico clínico e histológico positivo para pênfigo; 2. Ser voluntário para participar do estudo. Exclusão: Para pacientes: 1. Idosos; 2. Crianças; 3. Pacientes cuja gravidade das feridas ativas não permita a coleta. Para não pacientes: 1. Crianças; 2. Idosos; 3. Ter alguma doença que afete o sistema imunológico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos gerais - parte do projeto referente à genética de populações e evolutiva: 1. Análise populacional e evolutiva dos genes KIR e seus ligantes e de polimorfismos em genes que codificam citocinas e seus receptores, genes que codificam receptores ou ligantes de membrana ou outras moléculas que possam exercer algum papel na patogênese de doenças complexas, tais como as diferentes formas de pênfigo; 2. Descrever a diversidade intra e interpopulacional de polimorfismos genéticos, para melhor compreender as causas evolutivas da diversidade e para avaliar o impacto populacional das associações descritas para doenças e distúrbios multifatoriais; 3. Contribuir para o conhecimento das relações entre as populações humanas investigadas neste projeto e dessas com populações cujos dados encontram-se disponíveis na literatura científica. Objetivos gerais - parte do projeto referente ao estudo do pênfigo: 1. Obter informações que auxiliem a compreensão da patogênese de doenças multifatoriais e obter marcadores moleculares de atividade dessas doenças; 2. Contribuir para a compreensão do mecanismo geral que leva à autoimunidade, uma vez que este pode ser compartilhado por doenças autoimunes clinicamente distintas; 3. Investigar os possíveis mecanismos responsáveis pelas associações com doenças multifatoriais, entre as quais as várias formas de pênfigo, analisando as funções dos genes associados às doenças e as implicações funcionais de sua diversidade em ensaios de genética molecular e de biologia celular; 4. Contribuir ao conhecimento dos fatores genéticos que modulam a susceptibilidade/resistência ao pênfigo; 5. Contribuir para o desenvolvimento de terapias dirigidas a alvos específicos, para o tratamento do pênfigo e de outras doenças multifatoriais. Objetivos específicos - parte do projeto referente à genética de populações e evolutiva: 1. Descrever a diversidade populacional dos genes KIR, quanto a conteúdo gênico, diversidade alélica e haplotípica; 2. Identificar e estimar as frequências populacionais de alelos de genes que pudessem exercer algum papel na patogênese de doenças complexas. Entre outros, serão investigados os genes CD40, CD40L, BLYS, CD28, CTLA4, CD80, CD86 e IL6; 3. Testar a hipótese de neutralidade seletiva dos genes analisados; 4. Verificar a existência de polimorfismos ainda não descritos; 5. Verificar se as sequências nucleotídicas dos genes analisados apresentam evidências que possam levar à reconstrução de sua história evolutiva, incluindo a origem das famílias gênicas às quais pertencem, os eventos que levaram à sua diversificação e os fatores evolutivos que atuaram e atuam sobre estes genes; 6. Analisar a expressão dos alelos dos genes analisados, nos vários níveis de expressão Avaliar as funções dos genes analisados e as implicações funcionais de sua diversidade em ensaios de genética molecular e de biologia celular. Objetivos específicos - parte do projeto referente ao estudo do pênfigo: 1. Analisar as diferenças de reação de células T,

B, NKT e NK e outras, de pacientes e de indivíduos controle não afetados pela doença, ao estímulo in vitro com antígenos e com peptídeos derivados desses e com mitógenos e ao estímulo propiciado por células alvo; 2. Caracterizar e comparar o perfil de expressão gênica global entre amostras de tecido lesionado e não lesionado de pacientes com pênfigo, entre amostras de pacientes com diferentes formas da doença e entre amostras de pacientes e de indivíduos sadios; 3. Identificar rotas bioquímicas relevantes para a gênese da doença. 4. Identificar potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de terapias mais efetivas e específicas; 5. Caracterizar in vitro o efeito de anticorpos terapêuticos e de substâncias bioativas sobre células (PBMC) de pacientes de pênfigo e em linhagens celulares de outras doenças multifatoriais; 6. Identificar variações genéticas estruturais e reguladoras e epigenéticas que contribuem para a patogênese dessas doenças; 7. Analisar a regulação transcricional e pós-transcricional de genes possivelmente implicados na patogênese; 8. Analisar o efeito de variações polimórficas dos genes, associadas a doenças multifatoriais, nos vários níveis de expressão (RNAm, polipeptídeo/proteína).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram apresentadas as seguintes considerações pela pesquisadora responsável acerca dos possíveis riscos e benefícios resultantes da participação na pesquisa. Riscos: Não há riscos previstos para os indivíduos (pacientes e controles) envolvidos no projeto. Benefícios: O conhecimento adquirido através deste estudo poderá auxiliar na compreensão das causas da doença complexas. Isso poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos mais eficientes de prevenção e tratamento, com menos efeitos indesejados. Não há benefício direto desta pesquisa para os doadores de material biológico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto consiste em uma ampla investigação da genética de populações. Segundo informado, parte já foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humanos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e pela CONEP. A análise de polimorfismos em populações recebeu o registro nº 2046. A parte de análise dos aspectos genéticos e imunológicos do pênfigo foliáceo foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (registro número 020-05). Devido à inclusão de novos objetivos e à necessidade de aumento do tamanho das amostras populacionais, tanto de pacientes quanto de indivíduos livres de doença, o projeto atualizado foi submetido para nova análise ética. O projeto abrange uma ampla gama de estudos genéticos incluindo: 1. Análise da diversidade das populações; 2. Estudos de associação genética; 3. Análise do perfil de expressão gênica: (a) global de pacientes com doenças complexas, (b) de genes candidatos a estar associados às doenças complexas, considerando suas variantes

polimórficas e (c) das proteínas para as quais os genes candidatos codificam; e 4. Análise in vitro dos efeitos de compostos bioativos e de anticorpos monoclonais sobre células de pacientes com doenças complexas e controles sadios. Nas diferentes abordagens serão analisados genes HLA, KIR e outros com funções imunológicas importantes, incluindo CD80, CD86, CD40, CD40L, CTLA4, BAFF e genes que codificam para citocinas e outras moléculas de membrana celular e solúveis. Os trabalhos de pesquisa serão realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) e com as amostras disponíveis nas coleções deste laboratório e outras que serão coletadas no decorrer do projeto. Por meio do estudo populacional pretende-se compreender melhor os processos evolutivos que modulam as freqüências genicas em populações e o significado funcional da diversidade genética humana nas situações de saúde e de doença. Por meio das várias análises de expressão, assim como dos estudos de associação e das análises in vitro, pretende-se contribuir para o entendimento das patogêneses de doenças complexas (multifatoriais), principalmente do pênfigo, um grupo de doenças autoimunes da epiderme com elevada prevalência em certas regiões do Brasil e que pode levar seus portadores a óbito. Durante o período de execução da pesquisa pretende-se coletar novas amostras da população geral, não indígena, e de pacientes com pênfigo. Tais amostras serão analisadas e depositadas nos bancos do LGMH para serem somadas às amostras biológicas já existentes. Não serão coletadas amostras de indígenas. O banco de DNAs do LGMH vem sendo construído desde 1988 e atualmente conta com 2.559 amostras de várias populações. Estima-se que durante a execução do projeto em tela serão coletadas entre 50 e 100 amostras da população em geral e entre 20 e 50 amostras de pacientes de pênfigo. Além das amostras de DNA, também se pretende obter amostras de biopsias de pele dos mesmos pacientes de pênfigo. Consta a previsão de participação de 2710 sujeitos de pesquisa.

O estudo tem previsão de início em setembro de 2012 e término em março de 2016. O orçamento totaliza R$ 693.600,00 e será custeado pela Fundação Araucária, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Ver item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise do Recurso apresentado pelo pesquisador responsável referente ao Parecer CONEP nº 388.225 de 09/09/2013.

1. (Pendência "3" no Parecer CONEP 388.225) Considerando-se que está prevista a utilização de amostras derivadas de estudos anteriores mantidas armazenadas em Biorepositório, solicita-se a apresentação de:

a. cópia dos TCLEs empregados quando da coleta do material, contendo autorização de armazenamento e possível utilização futura em pesquisa, se o armazenamento ocorreu a partir da homologação da Resolução CNS no 196/96 (Resolução CNS 441/2011, item 15.II.b); e

b. TCLE específico para nova pesquisa ou a solicitação de sua dispensa (Resolução CNS 441/2011, item 15.II.c).

RESPOSTA: A quase totalidade do material armazenado, obtido durante estudos anteriores e que pretendemos utilizar neste estudo, foi coletada antes da homologação da Resolução CNS 196/96 e CNS 441/2011. A coleta e armazenamento deste material concordam com as normas éticas vigentes à época. Nas novas versões dos TCLE que estão sendo anexadas a essa versão revisada do processo, foi incluído um item referente à autorização ou não do uso do material biológico para pesquisas futuras, após aprovação pelo sujeito da pesquisa e pelos órgãos competentes (item "ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO").

Adicionalmente, foram modificados os textos do projeto de pesquisa (item 3.1 AMOSTRAS, página 15) e do formulário da Plataforma Brasil ("Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?" e "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do Pesquisador", ambos na página 5).

ANÁLISE: No referido item 3.1 do projeto lê-se: "O material biológico coletado após a homologação da Resolução CNS 196/96 e CNS 441/2011 e antes da aplicação dos novos TCLE, que obedecem a todas as normas vigentes, SÓ SERÁ UTILIZADO DEPOIS DA OBTENÇÃO DE UM NOVO TCLE. No caso em que se constate a impossibilidade da obtenção de um novo TCLE, será solicitado ao CEP sua dispensa" (grifo nosso). De forma equivalente, consta no informe inserido na Plataforma Brasil: "Para as amostras de material biológico coletado após a homologação da Resolução CNS 196/96 e CNS 441/2011 e antes da aplicação dos novos TCLE, que obedecem a todas as normas vigentes atualmente, sempre que possível (sic), os sujeitos de pesquisa serão recontatados para obtenção de autorização de armazenamento e possível utilização futura em pesquisa. O MATERIAL BIOLÓGICO NÃO SERÁ UTILIZADO ANTES DA OBTENÇÃO DE UM NOVO TCLE.

Nos casos em que se constate a impossibilidade de obtenção de um novo TCLE, será solicitado ao CEP sua dispensa (grifo nosso). No entanto, apesar de apontado no Parecer e indicado nos destaques supracitados, não foi apresentado modelo de TCLE específico e destinado aos indivíduos cujas amostras foram captadas no âmbito de pesquisas anteriores e encontram-se mantidas no LGMH. Os modelos de TCLE propostos, anexados ao protocolo, apenas contemplam os participantes cujas amostras ainda serão coletadas a partir da anuência. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RECURSO:

Preparamos agora TCLE específicos para pacientes e controles/genética de populações que serão submetidos à apreciação dos participantes da pesquisa contatados após o início do período de vigência da Resolução CNS 196/96 e antes da aplicação dos novos TCLE, dos quais há material biológico no LGMH. Esses TCLE estão sendo encaminhados em anexo.

Na Resolução CNS 196/96 foram estabelecidas restrições quanto ao uso do material biológico (itens III.3.t, IV.f, VI.3.c), porém não fora exigida a autorização de armazenamento no TCLE. Portanto, os TCLE dos projetos anteriores não incluíam autorização de armazenamento, porém a "estocagem" de material biológico estava explicitada no descritivo dos projetos aprovados pelo CEP e CONEP.

O armazenamento durante a etapa de execução de projetos de pesquisa sobre doenças multifatoriais que têm entre os fatores etiológicos numerosos genes, assim como em estudos de genética de populações, é uma condição sine qua non, pois as análises de polimorfismos genéticos se dão ao longo de um tempo bastante extenso, ao longo do período de execução do projeto, que dura vários anos. Essa situação estava prevista nos descritivos dos projetos anteriores que foram aprovados pelo CEP E CONEP e sempre foi devidamente esclarecida para cada indivíduo participante da pesquisa durante o processo de consentimento livre e esclarecido.

ANÁLISE: Cabe ressaltar que a inadequação apontada acima referia-se unicamente a não apresentação à análise ética de modelos de TCLE específicos destinados aos indivíduos cujas amostras foram captadas e armazenadas no âmbito de pesquisas anteriores. Em Atendimento, foram apresentados os modelos "TCLEpopulacoes_Out2013_NovaAutorizacao" e "TCLEpenfigoPacientesOut2013_NovaAutorizacao" considerados adequados às normativas éticas sobre uso de material biológico humano em pesquisas. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. (Pendência "4" no Parecer CONEP 388.225) Em relação ao projeto de pesquisa propriamente

dito, este não contem o plano de recrutamento dos indivíduos sem diagnóstico positivo de pênfigo e que serão incluídos na parte do projeto referente à genética de populações e evolutiva. Solicita-se adequação (Resolução CNS 196/96, item VI.3.d).

RESPOSTA: A forma de recrutamento foi descrita ao final do tópico 3.1.1 do projeto de pesquisa.

ANÁLISE: O referido tópico recebeu o seguinte acréscimo:

"O recrutamento se dá a partir da comunidade universitária de estudantes, servidores e professores e de seus contatos externos á comunidade universitária, para que se obtenha uma amostragem mais abrangente da população geral. Os critérios para inclusão são:

1. Estar livre de doenças que afetem o sistema imunológico;
2. Estar livre de doenças para as quais haja evidência de um componente genético;
3. Não receber tratamento que possa afetar as respostas imunes;
4. Ser voluntário para participar do estudo.

Critérios de exclusão:

1. Crianças;
2. Idosos".

Apesar do estabelecimento de critérios de inclusão e exclusão para seleção de indivíduos "pertencentes à população geral do estado do Paraná", os procedimentos inerentes ao recrutamento propriamente dito - definição dos local(is) e momento(s) apropriado(s) para a efetivação do processo de consentimento livre e esclarecido e subsequente captação da amostra e informações associadas - não foram apresentados. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RECURSO: O seguinte texto foi inserido na página 17 do protocolo de pesquisa (em anexo), em cor azul: "O projeto de pesquisa será divulgado para a comunidade universitária em palestras e nas salas de aula. Os estudantes, servidores técnico-administrativos e professores da Universidade poderão convidar seus contatos externos à comunidade universitária a comparecerem. Nas palestras o LGMH e a linha de pesquisa do grupo serão apresentados. Será feito um relato sobre os principais resultados anteriores do grupo de pesquisa. Os objetivos do projeto e as perspectivas futuras serão expostos. As implicações do trabalho para o participante e para o avanço do conhecimento científico serão comentadas. Serão dadas informações sobre o TCLE e sobre os procedimentos de coleta de sangue e obtenção do material biológico. Em seguida, será aberta a palavra para debate e perguntas. As mesmas informações repassadas nas palestras poderão ser dadas aos possíveis voluntários que não podem comparecer às palestras. Para os interessados em participar, será apresentado o TCLE para leitura e assinatura, em caso de consentimento. Em

seguida, será realizada a coleta da amostra de sangue".
ANÁLISE: Foi apresentado o plano de recrutamento, incluindo a definição dos local(is) e momento(s) destinados à efetivação do processo de consentimento livre e esclarecido, dos indivíduos sem diagnóstico positivo de pênfigo e que serão incluídos na parte do projeto referente à genética de populações e evolutiva. PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. (Pendência "5.g" no Parecer CONEP 388.225) Com relação ao armazenamento de material biológico consta o seguinte informe: "As amostras biológicas serão armazenadas no Biorrepositório de Amostras do Laboratório de Genética Molecular Humana, na Universidade Federal do Paraná, por um período de cinco anos e, caso necessário, este período será prorrogado após a aprovação por parte do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e o material poderá permanecer armazenado para pesquisas futuras se em conformidade com as normas do CNS" (seção ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS). No entanto, "É indispensável que conste também que o sujeito será contatado para conceder ou não autorização para uso do material em futuros projetos e que quando não for possível, o fato será justificado perante o CEP. Explicitar também que o material somente será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e pela CONEP (quando for o caso)" (Resolução CNS 340/2004, item V.1.e). Solicita-se adequação.
RESPOSTA: Em ambos os TCLE, a seção "ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS" foi substituída por "ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO". O texto foi modificado de acordo com o solicitado e com a Resolução CNS 441/2011, itens 2. II. e 2. III.
ANÁLISE: Na referida seção foram inseridas as seguintes questões para decisão do indivíduo convidado a participar da pesquisa:
"( ) Sim, concordo com que o material biológico seja depositado no Biorrepositório acima citado para que seja utilizado em pesquisas previamente aprovadas pelo CEP e CONEP (quando for o caso).
( ) Quero ser consultado a cada nova pesquisa, para conceder ou não autorização para uso do material biológico armazenado".
No entanto, uma vez que o banco de materiais biológicos humanos estará constituído como um Biorrepositório ("coleção de material biológico humano, COLETADO E ARMAZENADO AO LONGO DA EXECUÇÃO DE UM PROJETO DE PESQUISA ESPECÍFICO, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais"), e não como um Biobanco, a possibilidade de autorização a priori de pesquisas futuras e da dispensa de novo contato para obtenção de consentimento

específico não são aplicáveis. Ressalta-se que o consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrepositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS 441/11, item 6). Além disso, em relação à possibilidade de dispensa de aplicação de TCLE, a diretriz contida no item IV.8 da Resolução CNS 466/2012 informa que "Nos casos em que seja inviável a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou que esta obtenção signifique riscos substanciais à privacidade e confidencialidade dos dados do participante ou aos vínculos de confiança entre pesquisador e pesquisado, a dispensa do TCLE deve ser justificadamente solicitada pelo pesquisador responsável ao Sistema CEP/CONEP, para apreciação, sem prejuízo do posterior processo de esclarecimento". Portanto, em particular, a segunda questão posta à apreciação do indivíduo não é aceitável. Finalmente, mantém-se o destaque apontado no Parecer CONEP 112.962: "É indispensável que conste também que o sujeito será contatado para conceder ou não autorização para uso do material em futuros projetos e que quando não for possível, o fato será justificado perante o CEP. Explicitar também que o material somente será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e pela CONEP (quando for o caso)" (Resolução CNS 340/2004, item V.1.e). PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RECURSO: As novas versões dos TCLE se encontram em anexo. Esperamos ter conseguido sanar as deficiências. Para revisão, consultamos pesquisadores de UFPR e de outras instituições que tiveram recentemente aprovados protocolos de pesquisa similares ao nosso. Nos TCLE, as adequações estão destacadas em cor azul e alguns comentários sobre alterações secundárias foram inseridos. Em particular, destacamos aqui as seguintes alterações:
TCLE "populaces" e "pacientes", item "ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO".
"Caso você autorize, seu material biológico e informações associadas permanecerão armazenados em biorrepositório para utilização no projeto citado acima. Caso haja necessidade de utilizá-lo no futuro, você será contatado para consentir ou não sobre o novo uso de sua amostra. Nesse caso, seu consentimento será formalizado através de um novo TCLE específico. Quando isso não for possível, o fato será justificado perante o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material será submetida à apreciação do CEP e sempre que couber também da CONEP, em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS nº 441/2011). Seu material biológico será armazenado por 05 anos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Luiza Petzl Erler, sendo que, se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o

Comitê de Ética. Contudo, a qualquer momento você poderá solicitar que seu material biológico não seja mais utilizado, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você. Entretanto, o material biológico poderá ser descartado devido à inadequação por critérios de qualidade, seguindo normas definidas na legislação brasileira.¿

TCLE "populaces" e "pacientes", texto inserido antes do campo de assinaturas:

"Eu,_____ abaixo assinado, declaro que li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja, os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu material biológico sabendo que, se houver uma nova pesquisa, essa será avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e sempre que couber também pela CONEP e que serei contatado novamente, para consentir ou não o uso de meu material, através de um TCLE específico."

ANÁLISE: As adequações necessárias foram realizadas. Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

BRASÍLIA, 02 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)