

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA MACIEL CAMARGO



EXPRESSÃO GÊNICA E POLIMORFISMOS DE *CD33*, *LAIR1* E *LAIR2* EM  
POPULAÇÕES E EM PÊNFIGO FOLIÁCEO

CURITIBA

2015

CAROLINA MACIEL CAMARGO



EXPRESSÃO GÊNICA E POLIMORFISMOS DE *CD33*, *LAIR1* E *LAIR2* EM  
POPULAÇÕES E EM PÊNFIGO FOLIÁCEO

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. Maria Luiza Petzl-Erler.

Coorientador: Dr. Danilo Gardenal Augusto.

CURITIBA

2015

## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **CAROLINA MACIEL CAMARGO**, 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. Secretária da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 26 de junho de 2015



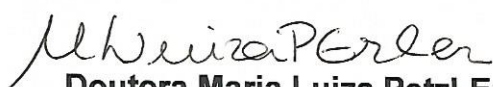
**Doutora Marcia Regina Pincerati**  
Universidade Positivo – Membro Titular



**Doutora Priscilla Fanini Wowk**  
Instituto Carlos Chagas – Membro Titular



**Doutor Rodrigo Coutinho de Almeida**  
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular



**Doutora Maria Luiza Petzi-Erler**  
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



**Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

**Prof<sup>o</sup> Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza**  
Coordenador do PPG - GEN - UFPR  
Matrícula 176702

Aos meus pais.

Aos pacientes de pênfigo. Compartilho com vocês a esperança por dias melhores!

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Maria Luiza meus sinceros agradecimentos pela oportunidade e pelos sábios ensinamentos. Foi uma honra ser sua orientada durante esses últimos anos!

Agradeço ao meu coorientador Danillo pelos ensinamentos, pelas valiosas contribuições a esse trabalho, e pelo bom humor e energia contagiantes!

Agradeço a minha amiga e ex-orientadora Dani, uma pessoa muito especial e excelente profissional, que me inspirou a seguir a carreira acadêmica.

Agradeço aos meus queridos colegas e amigos do lab: Ana Carolina, Andressa, Amanda, Áurea, Bruno, Débora, Eduardo, Nôra, Gabi (ele), Gabi (ela), Liana, Lu, Márcia, Mari, Maria Carolina, Max, Pedro, Regis, Rodrigo, Sara, Sheyla, Simone, Tânia, Ticiane e Vero pela amizade, pela companhia agradabilíssima e por toda a ajuda que vocês me deram. Agradeço à Li, pelas horas que dedicamos juntas no Sequenom e pelos muitos ensinamentos; e um agradecimento especial ao Gabi, pela amizade sincera, pelas viagens, pelos momentos de descontração, e pelos muitos ensinamentos que você me passou. Agradeço também às queridas professoras Angélica e Karin, que chegaram para trazer ainda mais qualidade ao LGMH.

Meus agradecimentos ao Dr. Giorgio Baldanzi, chefe do setor de Hemoterapia do HC, pela permissão concedida de obtenção das amostras de sangue dos doadores, à equipe de técnicos de enfermagem e em especial às enfermeiras Lídia, Layara, Kelly e Sônia pelo apoio e carinho.

Agradeço aos participantes que aceitaram a doar um pouquinho de sangue, e sem os quais esse trabalho não seria possível. Um agradecimento especial aos pacientes, que apesar de todo o sofrimento sempre nos receberam da melhor maneira possível.

Agradeço ao meu amigo, esposo, companheiro, meu *babe* Ben, que sempre esteve ao meu lado. Ao meu irmão, a quem eu admiro muito. E aos meus pais, meus ícones, pelo amor e apoio incondicionais, que literalmente deram o sangue por esse trabalho!

E a todos os amigos que indiretamente me ajudaram nesse trabalho.

*You've got the music in you*  
*Don't let go*  
*You've got the music in you*  
*One dance left*  
*This world is gonna pull through*  
*Don't give up*  
*You've got a reason to live*  
***Can't forget***  
***We only get what we give***

New Radicals

## RESUMO

CD33, LAIR-1 e LAIR-2 são receptores semelhantes a imunoglobulina expressos pela maioria das células das linhagens mielóide e linfóide, e são importantes reguladores das respostas imunes. CD33 e LAIR-1 são receptores transmembrana, e LAIR-2 é um homólogo solúvel de LAIR-1 que antagoniza as funções inibidoras deste ao competir pelos mesmo ligantes. Essas proteínas são codificadas por genes localizados no complexo de receptores leucitários (LRC) estendido, no cromossomo 19q13.4. Nesse estudo, investigamos se polimorfismos de base única (SNP) de *CD33*, *LAIR1* e *LAIR2* contribuem para susceptibilidade ao pênfigo foliáceo (PF), uma doença autoimune da pele, endêmica no Brasil e caracterizada por autoanticorpos anti-desmogleína 1. A genotipagem foi realizada pelo método iPLEX MassARRAY (Sequenom, San Diego, CA). Encontramos associação de três SNPs de *CD33* com PF em uma amostra de indivíduos de ascendência predominantemente europeia (*rs273640* T+, OR=0.48,  $p=0.0025$ ; *rs2455069* G+, OR=0.53,  $p=0.0063$ ; *rs1803254* C/C, OR=1.9,  $p=0.0076$ ), e associação de um quarto SNP em uma amostra de ascendência mista (*rs3865444* G+, OR=0.52,  $p=0.0151$ ). Dois SNPs de *LAIR1* (*rs56802430* G, OR=1.52,  $p=0.0329$ ; *rs11084332* C, OR=0.57,  $p=0.0022$ ) e um de *LAIR2* (*rs2287828* T+, OR=1.9,  $p=0.0097$ ) também contribuem para susceptibilidade ao PF. Além das associações individuais, observamos interações entre três SNPs de *CD33* e quatro SNPs de *LAIR2*, que estão associados com PF em análises estratificadas. Adicionalmente, analisamos os níveis de RNAm de *CD33*, *LAIR1* and *LAIR2* por PCR quantitativa em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de controles. Nossos resultados demonstram que genótipos e haplótipos protetores ao PF estão associados com baixos níveis de *CD33m*, e que um haplótipo formado por quatro SNPs de *LAIR2* está associado com maior susceptibilidade ao PF (OR=4.12,  $p=0.002$ ) e com maior expressão de *LAIR2* ( $p=0.007$ ). Não encontramos relação entre expressão de *LAIR1* e susceptibilidade ao PF. Nossos resultados sugerem que polimorfismos de *CD33*, *LAIR1* e *LAIR2* contribuem para susceptibilidade ao PF, e que a expressão diferencial de *CD33* e *LAIR2* possivelmente influencia a patogênese da doença.

**Palavras-chave:** *LAIR1*, *LAIR2*, *CD33*, pênfigo foliáceo, autoimunidade, susceptibilidade genética.

## ABSTRACT

CD33, LAIR-1 and LAIR-2 are immunoglobulin-like receptors expressed in the majority of myeloid and lymphoid cells, and are important regulators of immune responses. CD33 and LAIR-1 are membrane-bound receptors, whereas LAIR-2 is a soluble homolog of LAIR-1 that antagonizes LAIR-1 inhibitory function by binding the same ligands. These proteins are coded by genes located within the extended region of the leukocyte receptor complex (LRC), in the chromosome 19q13.4. In this study, we analyzed if *CD33*, *LAIR1* and *LAIR2* single nucleotide polymorphisms (SNP) contribute to differential susceptibility to pemphigus foliaceus (PF), an autoimmune blistering skin disease endemic in Brazil and characterized by desmoglein-1 specific autoantibodies. SNPs were analyzed by mass spectrometry-based genotyping (Sequenom, San Diego, CA). We report association of three *CD33* SNPs with variable susceptibility to PF in a European predominant ancestry population (*rs273640* T+, OR=0.48,  $p=0.0025$ ; *rs2455069* G+, OR=0.53,  $p=0.0063$ ; *rs1803254* C/C, OR=1.9,  $p=0.0076$ ), and association of a fourth SNP in an admixed population (*rs3865444* G+, OR=0.52,  $p=0.0151$ ). We also found that two *LAIR1* (*rs56802430* G, OR=1.52,  $p=0.0329$ ; *rs11084332* C, OR=0.57,  $p=0.0022$ ) and one *LAIR2* SNP (*rs2287828* T+, OR=1.9,  $p=0.0097$ ) contribute for differential susceptibility to PF. Moreover, we observed interactions among three *CD33* and four *LAIR2* SNPs that are associated with PF in stratified analysis. Additionally, we measured *CD33*, *LAIR1* and *LAIR2* mRNA expression levels by real time PCR. We demonstrate that protective genotypes and haplotypes mark lower expression levels of *CD33m*, a mRNA *CD33* variant. One *LAIR2* haplotype harboring four interacting SNPs is strongly associated with higher susceptibility with PF (OR=4.12,  $p=0.002$ ) and also with higher *LAIR2* expression ( $p=0.007$ ). We found no evidence of association between *LAIR1* expression and PF susceptibility. Our data suggests that *CD33*, *LAIR1* and *LAIR2* genetic variants impact PF susceptibility, and that *CD33* and *LAIR2* variable expression possibly influences PF pathogenesis.

**Keywords:** *LAIR1*, *LAIR2*, *CD33*, pemphigus foliaceus, autoimmunity, genetic susceptibility.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>12</b>
2.1. PÊNFIGO FOLIÁCEO.....	12
2.1.1. Epidemiologia .....	12
2.1.2. Etiologia.....	13
2.1.3. Tratamento .....	15
2.1.4. Patogênese.....	15
2.2. RECEPTORES LEUCOCITÁRIOS E A REGIÃO 19q13.4 .....	18
2.3. LAIR-1 e LAIR-2.....	20
2.3.1. Estrutura das moléculas .....	20
2.3.2. Genes e transcritos.....	22
2.3.3. Função.....	24
2.3.4. Expressão.....	25
2.4. CD33.....	29
2.4.1. Genes, transcritos e estrutura do receptor.....	29
2.4.2. Função e expressão .....	32
2.4.3. CD33 e pênfigo.....	36
<b>3. HIPÓTESES E JUSTIFICATIVAS .....</b>	<b>38</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5. ARTIGOS.....</b>	<b>40</b>
<b>LAIR2 POLYMORPHISMS MARK DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION LEVELS AND INFLUENCE SUSCEPTIBILITY TO PEMPHIGUS .....</b>	<b>40</b>
<b>CD33 POLYMORPHISMS ARE ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION AND VARIABLE SUSCEPTIBILITY TO PEMPHIGUS FOLIACEUS.....</b>	<b>61</b>
<b>6. RESULTADOS ADICIONAIS E DISCUSSÃO FINAL .....</b>	<b>88</b>
6.1. RESULTADOS ADICIONAIS .....	89
6.2. DISCUSSÃO.....	95
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>127</b>
<b>APÊNDICE 1 - TABELAS E FIGURAS DOS RESULTADOS ADICIONAIS .....</b>	<b>127</b>
<b>APÊNDICE 2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>156</b>
<b>ANEXO 1 - FICHA DE AVERIGUAÇÃO - PÊNFIGO.....</b>	<b>156</b>
<b>ANEXO 2 - FICHA DE AVERIGUAÇÃO - CONTROLES .....</b>	<b>161</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O pênfigo é um grupo de doenças autoimunes órgão-específicas caracterizadas por bolhas intraepidermais e pela produção de autoanticorpos patogênicos direcionados contra as caderinas desmossômicas desmogleína-3 no pênfigo vulgar (PV) e desmogleína-1 no pênfigo foliáceo. O pênfigo foliáceo endêmico (PF) é um dos tipos clínico-epidemiológicos desse grupo de doenças, que apresenta sua maior incidência no Brasil e se caracteriza pela presença de lesões cutâneas mais superficiais, enquanto no PV as lesões podem ser mucocutâneas e ocorrem em camadas mais profundas da epiderme.

O PF é uma doença complexa e, como tal, envolve a participação de múltiplos fatores genéticos e ambientais em sua etiopatologia. Diversas associações genéticas com o PF já foram descritas pelo nosso grupo. Mais recentemente, em um estudo de expressão gênica global, foi demonstrado que diversos genes localizados na região 19q13 estão diferencialmente expressos em linfócitos T CD4+ de pacientes de PF e PV. A região 19q13.4 contém o complexo receptor de leucócitos (*LRC*, do inglês *leukocyte receptor cluster*) que abriga, entre outros, os genes dos receptores das células NK (do inglês *natural killer*) semelhantes à imunoglobulina (Ig) (*KIR*, do inglês *killer-cell immunoglobulin-like receptors*), que estão associados com PF. Também nessa região estão localizados os genes que codificam os receptores associados aos leucócitos semelhantes à Ig (*LAIR*, do inglês *leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor*), e o agrupamento dos genes que codificam as lectinas semelhantes a Ig ligantes de ácido siálico (*Siglecs*, do inglês *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*). *CD33* (um *Siglec*) e *LAIR1* são genes diferencialmente expressos em PF e PV e codificam receptores inibidores expressos em leucócitos e relacionados com a autoimunidade e respostas inflamatórias. *LAIR2* é um gene localizado na mesma região, e codifica um receptor solúvel que antagoniza as funções inibidoras de LAIR-1. Assim como LAIR-1, a expressão diferencial proteica de LAIR-2 está relacionada com fenótipos autoimunes e com a regulação de respostas inflamatórias. *CD33* é um autoantígeno em PV, e associações entre polimorfismos de *CD33* e *LAIR2* e PF foram previamente descritas pelo nosso grupo.

Com base na importância desses receptores na regulação de respostas imunes e em evidências do envolvimento dos genes com o pênfigo, hipotetizamos que polimorfismos de *CD33*, *LAIR1* e *LAIR2* marcam a expressão diferencial a nível de RNAm, e que polimorfismos e a expressão diferencial desses genes interferem na susceptibilidade ao pênfigo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. PÊNFIGO FOLIÁCEO

O pênfigo (do grego *pemphix*, que significa bolha) é um grupo de doenças autoimunes órgão-específicas, cuja manifestação consiste em vesículas e bolhas intraepidermais. No pênfigo foliáceo, as bolhas ocorrem na pele e a desmogleína-1 (DSG1) é o principal determinante antigênico. O pênfigo vulgar (PV) é um tipo clínico de pênfigo mais comum e mais grave, e caracteriza-se por bolhas mais profundas na pele e nas mucosas e pela produção de autoanticorpos direcionados contra a DSG1 e DSG3.

Existem duas formas de pênfigo foliáceo: o pênfigo de Cazenave e o pênfigo foliáceo endêmico (PF) ou fogo selvagem, que diferem em fatores clínicos mas principalmente em fatores epidemiológicos. O pênfigo de Cazenave consiste em uma forma esporádica de pênfigo foliáceo e apresenta distribuição mundial, diferentemente do endemismo característico do PF (CASTRO; PROENÇA, 1982).

O pênfigo foliáceo pode se manifestar de duas formas: localizada ou generalizada. Na forma localizada, as bolhas ou vesículas ocorrem nas áreas seboreicas da pele – face, cabeça, pescoço e parte superior do tronco. Pacientes com a forma localizada da doença podem evoluir para a forma generalizada, na qual as lesões são disseminadas pelo tronco, abdômen e membros superiores e inferiores, além da face e couro cabeludo (AOKI; SOUSA; DIAZ, 2011).

#### 2.1.1. Epidemiologia

O PF é endêmico no Brasil, onde apresenta sua maior incidência (DIAZ et al., 1989). A doença já foi descrita em outros países da América do Sul e Central, tais como Colômbia (ROBLEDO et al., 1988), e em países do norte da África, principalmente Tunísia (ABRÉU-VÉLEZ et al., 2010; MORINI et al., 1993). No Brasil, o PF atinge sua maior prevalência nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. No final do século XX, o número total de casos relatados de PF no Brasil era de 15 mil (DIAZ et al., 1989). A reserva indígena Terena de Limão Verde, no Mato Grosso do Sul, apresenta mais de 3% de

prevalência de PF e uma incidência de 1 a 4 novos casos por ano em uma população de aproximadamente 1200 indivíduos, enquanto a prevalência da doença em outras reservas Terena no mesmo estado é baixa (0,1%) (HANS-FILHO et al., 1996). É interessante observar que estas outras regiões diferem de Limão Verde em termos de geografia e ecologia (WARREN et al., 2000). Na população de índios Xavante do estado de Mato Grosso, a prevalência de PF é de aproximadamente 1,34% (FRIEDMAN et al., 1995). Em comparação, a incidência estimada de pênfigo esporádico nos Estados Unidos e Europa é de menos de 1 caso por milhão de habitantes por ano (JOLY e LITROWSKI; 2011).

O PF normalmente afeta crianças e jovens adultos que vivem em áreas rurais e tribos indígenas, e aparentemente não há predileção por sexo ou etnia. A doença é frequente em ambientes rurais em processo de colonização, mas a ocorrência de PF diminui com a urbanização dessas áreas (DIAZ et al., 1989). A distribuição geográfica da doença, a ocorrência de casos familiares, a agregação temporal e a maior ocorrência entre crianças e jovens adultos diferenciam o PF de outros pênfigos, evidenciam o caráter de doença complexa do PF e sugerem que a exposição recorrente a determinados fatores ambientais é crucial para o desenvolvimento da doença (CULTON et al., 2008; DIAZ et al., 1989).

### 2.1.2. Etiologia

A exposição a picadas de insetos hematófagos parece estar envolvida diretamente com a etiologia do PF. Pacientes de PF apresentam significativamente mais picadas de borrachudos (*Simulium nigrimanum*) em comparação com controles sadios endêmicos (LOMBARDI et al., 1992; AOKI et al., 2004a), assim como mais picadas de barbeiros e percevejos (AOKI et al., 2004a), o que também demonstra que a situação precária de moradia é um fator de risco para o PF. O papel de *Simulium nigrimanum* no desenvolvimento do PF é suportado por mais um estudo que demonstrou que a distribuição geográfica desses insetos coincide com as áreas endêmicas de PF, e a ocorrência desses insetos é pouco frequente em áreas vizinhas não-endêmicas (EATON et al., 1998). A maior parte das áreas endêmicas de PF se sobrepõem com aquelas áreas de ocorrência da doença de Chagas e leishmaniose (VIEIRA et al., 1940 *apud* AOKI et al., 2015), e anticorpos não patogênicos anti-DSG1 são encontrados em pacientes de leishmaniose, doença de

Chagas e oncocercose (DIAZ et al., 2004). No entanto, a doença de Chagas e oncocercose não são prevalentes na reserva Terena de Limão Verde, apesar da presença de seus vetores na região (DIAZ et al., 2004). Um estudo recente demonstrou que o soro de pacientes com PF não reage contra *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (SOUSA et al., 2012). No entanto, o soro dos pacientes é reativo contra uma proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis* (mosquito palha), um dos vetores da leishmaniose (QIAN et al., 2012). Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que autoanticorpos anti-DSG1 de pacientes de PF também reagem contra a proteína salivar do mosquito, e há produção de anticorpos anti-DSG1 quando modelos murinos são imunizados com essa proteína salivar. Essas evidências sugerem que um antígeno presente nos insetos hematófagos, e não nos parasitas, participa da formação da resposta imune do PF. Além disso, o número de casos de PF é maior durante o fim da estação chuvosa nas áreas endêmicas, sugerindo que o aumento do número de insetos e o aumento do número de pacientes estão diretamente relacionados (CULTON et al., 2008).

Além da saliva de insetos hematófagos, outros fatores etiológicos foram propostos por estar envolvidos no desencadeamento da resposta imune do PF, tais como infecções virais e bacterianas (ANGULO, 1954; LOMBARDI et al., 1992), alguns alimentos (alho, cebola, alho poró) (BRENNER e WOLF, 1994), metais (mercúrio, cobre), iodo, solventes orgânicos, sílica, radiação ultravioleta, ozônio, L-triptofano (ABRÉU-VÉLEZ et al., 2010).

Li et al. (2003) propuseram uma hipótese de mecanismo etiológico para o PF no qual ocorre uma reação cruzada entre a DSG1 e um antígeno ambiental. Nesse modelo, em um primeiro estágio um antígeno ambiental que possui uma sequência semelhante ao domínio EC5 da DSG1 desencadeia uma resposta não patogênica à DSG1. Nessa fase, o indivíduo não apresenta lesões cutâneas. A seguir, em certos indivíduos que apresentam susceptibilidade genética, ocorre o fenômeno do espalhamento intramolecular de epítomos, através do qual algum dano tecidual acaba por expor epítomos diferentes daqueles que geraram a resposta não patogênica inicial e que antes não eram detectados pelo sistema imune, levando à produção de autoanticorpos direcionados contra aos domínios EC1 e EC2 da DSG1 e induzindo a acantólise. Diaz et al. (2004) propuseram que a saliva de insetos hematófagos pode ser a molécula que desencadeia a produção de anticorpos anti-DSG1.

Realmente, anticorpos contra diferentes epítomos da DSG1 são encontrados em indivíduos nas fases pré-clínica e clínica do PF. Os anticorpos anti-DSG1 de indivíduos saudáveis e aqueles na fase pré-clínica da doença reconhecem o domínio EC5 da molécula. A transição da fase pré-clínica para a fase clínica é acompanhada pelo surgimento de anticorpos específicos contra os domínios EC1 e EC2 da DSG1 (Li et al., 2003).

### 2.1.3. Tratamento

O prognóstico da doença avançou significativamente desde a década de 1950, quando o tratamento do pênfigo passou a ser feito com esteroides sistêmicos (CULTON et al., 2008). Atualmente, os pacientes de PF são tratados principalmente com prednisona, mas também são utilizados triancinolona e deflazacort, entre outros esteroides. As lesões aumentam a chance de infecção bacteriana e, nesses casos, utilizam-se antibióticos sistêmicos. Muitas vezes é feito o uso conjunto de corticosteroides e imunossupressores, tais como azatioprina, ciclofosfamida e ciclosporina (CUNHA; BARRAVIERA, 2009).

### 2.1.4. Patogênese

As bolhas no pênfigo foliáceo são subcórneas e derivam do processo de acantólise, ou seja, perda de adesão entre os queratinócitos, células que constituem a maior parte da epiderme. A principal estrutura de adesão da epiderme são os desmossomos, cujo centro é formado pelos domínios extracelulares das desmogleínas e desmocolinas, subfamílias de proteínas transmembrânicas pertencentes à superfamília das caderinas (DELVA et al., 2009). A perda de adesão entre os queratinócitos envolve a produção de autoanticorpos patogênicos principalmente contra DSG1, mas pacientes de pênfigo apresentam autoanticorpos contra outras moléculas que participam da adesão da pele, tais como receptores colinérgicos, desmocolina 1, 2 e 3; E-caderina; desmogleína 2, 3 e 4 (NGUYEN et al., 1998; KURZEN; BRENNER, 2006; FLORES et al., 2012), e contra outros antígenos tais como receptores de membrana, antígenos imunológicos, neuronais e tireogástricos (GRANDO, 2012; KALANTARI-DEHAGHI et al., 2011; KALANTARI-DEHAGHI et al., 2013)

O processo de acantólise permanece desconhecido. Foi sugerido que anticorpos anti-DSG induzem acantólise por impedimento estérico, mecanismo no qual a ligação de anticorpos bloqueia as interações adesivas das DSG (DIAZ; MARCELO, 1978). Realmente, foi demonstrado que imunoglobulinas (Ig)-G purificadas de soro de pacientes com pênfigo foliáceo causam a dissociação de queratinócitos *in vitro*, no entanto, em um modelo sem células essas IgG não inibem a interação de moléculas DSG1 por impedimento estérico (WASCHKE et al., 2005). Não obstante, IgG de PV inibem a interação de DSG3 *in vitro* (HEUPEL et al., 2008), ou seja, o modelo parece ser válido apenas para PV. Outros estudos demonstram que a ligação de anticorpos de PV à superfície celular resulta na depleção de DSG através da endocitose dos complexos anticorpo-DSG, e o processo é acompanhado da diminuição da adesão entre as células (CALKINS et al., 2006; CIRILLO et al., 2007; PATEL et al., 1984). Além do impedimento estérico e depleção de DSG, a terceira principal hipótese para a acantólise é o desencadeamento de eventos intracelulares através da interação de autoanticorpos, que indiretamente resulta em acantólise (BERKOWITZ et al., 2005; CALDELARI et al., 2001; CHERNYAVSKY et al., 2007; FRUSIĆ-ZLOTKIN et al., 2006; SHARMA et al., 2007). A apoptose dos queratinócitos em resposta à ligação de anticorpos é um modelo extensamente investigado, e diversos estudos demonstram que o mecanismo está relacionado à acantólise (ARREDONDO et al., 2005; BARONI et al., 2004; GNIADOCKI et al., 1998; LI et al., 2009; PUVIANI et al., 2003). Esses estudos demonstram que autoanticorpos IgG de PV ou soro de PV induzem a apoptose, que é mensurada por vários meios, tais como ligação de anexina V, formação de oligonucleossomos, ativação de caspases e desbalanço de moléculas relacionadas à apoptose (Fas, FasL, Bax, p53, Bcl-2, FLIP-I). Também foi proposto que IgG pode induzir enzimas apoptóticas, mas que estas não resultam em morte celular e sim em acantólise, num mecanismo conhecido como apoptólise (GRANDO et al., 2009). No entanto, alguns estudos demonstram que a apoptose não é necessária à acantólise, pois ocorre posteriormente ao desprendimento das células (LEE et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009), ou porque não foram encontradas células apoptóticas ou evidências de sinalização apoptótica em lesões de pacientes (JANSE et al., 2014). Portanto, cascatas de sinalização que levam à apoptose podem participar da acantólise, mas não são causadoras desse fenômeno (SCHMIDT; WASCHKE, 2009).



Pacientes com pêfigo apresentam autoanticorpos circulantes no soro, assim como depósitos intercelulares de imunoglobulinas nas membranas dos queratinócitos da pele lesionada e depósitos de complemento, especialmente C3 (MARTEL; JOLY, 2001). A subclasse de anticorpos predominante do PF é a IgG4, mas também são detectados IgG1, IgG2, IgG3, IgE e IgM (JONES; HAMILTON; JORDON, 1988; ROCK et al., 1989; TREMEAU-MARTINAGE et al., 1995 *apud* MARTEL; JOLY, 2001; DIAZ et al., 2008; QIAN et al., 2011). A detecção dos IgG é importante durante o desenvolvimento da doença, pois títulos negativos de IgG4 relacionam-se com a remissão da doença, e títulos positivos são detectados na doença em atividade (WARREN et al., 2003; AOKI et al., 2004b). Assim como a transição da fase pré-clínica para a fase clínica do PF é marcada por uma mudança da especificidade dos anticorpos, diferentes isotipos de anticorpos também marcam essa transição. De acordo com Warren et al. (2003), pacientes com a doença ativa e em remissão e indivíduos saudáveis das áreas endêmicas apresentam os mesmos níveis de IgG1. Seus resultados demonstram que há uma progressão de IgG1 para IgG4 durante a evolução do PF e que, portanto, a aquisição de uma resposta IgG4 é crucial para o desenvolvimento da doença. Indivíduos em diferentes estágios da doença foram testados por meio da análise sorológica de IgG4 anti-DSG1, e foi demonstrado que o período entre a fase pré-clínica e a doença ativa pode durar até 10 anos (QAQISH et al., 2009). Também é detectado mais IgM anti-DSG1 em pacientes com PF vivendo em áreas rurais e em controles sadios de áreas endêmicas em comparação com pacientes e controles que vivem em áreas urbanas. A imunização de indivíduos a um antígeno desencadeia uma resposta imune inicial caracterizada por anticorpos IgM, e a reexposição ao mesmo antígeno proporciona uma resposta secundária, na qual os anticorpos característicos são os IgG. Portanto, esses resultados demonstram que a doença provavelmente é desencadeada pela exposição recorrente a fatores ambientais (DIAZ et al., 2008). Pacientes com PF apresentam também mais IgE anti-DSG1 do que pacientes com a forma esporádica de pêfigo foliáceo. Esse resultado mais uma vez sugere que a importância dos fatores ambientais no PF, já que anticorpos IgE são detectados em indivíduos que são expostos cronicamente a alérgenos ou a imunoterapia (AOKI; SOUSA; DIAZ, 2011; QIAN et al., 2011).

A resposta celular é essencial na patogenia do PF já que a produção de anticorpos pelas células B requer a interação com células T auxiliares CD4+. Além

disso, os estudos de associação entre o complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) evidenciam a importância de genótipos HLA-DR na patogênese do PF (MORAES et al., 1991, 1997; PAVONI et al., 2003; PETZL-ERLER; SANTAMARIA, 1989). Lin et al. (2000) demonstraram que linfócitos T CD4+ circulantes de pacientes com PF proliferam e apresentam uma resposta antígeno-específica restrita ao HLA-DR e direcionada ao DSG1. Essas células T reativas exibiram um fenótipo de células T de memória e produziram interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-6, mas não interferon (IFN)- $\gamma$ , sugerindo que essas células produzem um perfil de citocinas do tipo Th2 (do inglês *T helper 2-like*). Na pele lesionada de pacientes, há um maior número de células T CD4+ em comparação com o tecido não-lesionado (SANTI; SOTTO, 2001) e essas células também apresentam um perfil de citocinas Th2 (CAPRONI et al., 2001).

Aproximadamente 18% dos casos de pacientes com PF são familiares (AUAD, 1972 *apud* AOKI et al., 2004a). Além da agregação familiar, a associação de diversos polimorfismos com o PF evidenciam a importância dos fatores genéticos no desenvolvimento da doença. *HLA-DR1* e *HLA-DR4* são fatores de susceptibilidade ao PF, enquanto *DQ2* confere proteção (PETZL-ERLER; SANTAMARIA, 1989). Outras associações com alelos *HLA* também foram descritas (MORAES et al., 1991, 1997; PAVONI et al., 2003). Com relação a outros genes, já foram encontradas associações de variantes genéticas de *IL6*, *IL4* (PEREIRA et al., 2004), morte celular programada 1 (*PDCD1*) (BRAUN-PRADO; PETZL-ERLER, 2007), *CD40*, *CD40L* e *BLYS* (MALHEIROS; PETZL-ERLER, 2009), proteína transativadora de MHC de classe II (*CIITA*) (PIOVEZAN; PETZL-ERLER, 2013), e *KIR* (AUGUSTO, et al., 2012, 2015) com o PF. Associações não foram encontradas com fator de necrose tumoral (*TNF*), linfotóxina  $\alpha$  (*LTA*) (ROXO et al., 2003), antígeno 4 de linfócito T citotóxico (*CTLA4*) (PAVONI et al., 2006), *BAX* e *TP53* (KOHLENER; PETZL-ERLER, 2006) e *DSG1* (PETZL-ERLER; MALHEIROS, 2005).

## 2.2. RECEPTORES LEUCOCITÁRIOS E A REGIÃO 19q13.4

As respostas imunes são extensivamente reguladas através do balanço entre sinais ativadores e inibidores, desencadeados pela interação entre receptores celulares e seus ligantes. Nas células linfoides e mieloides, esses receptores desempenham funções essenciais em diversos processos celulares, como ativação

celular, diferenciação, proliferação, morte celular, adesão, quimotaxia e secreção de mediadores solúveis (MUNITZ, 2010; THAVENTHIRAN, 2013). Dessa maneira, esses receptores podem definir *thresholds* de ativação, regular ou finalizar respostas imunes (STEEVELS; MEYAARD, 2011), e assim contribuem para a homeostase do sistema imune. A importância desses receptores na regulação das respostas imunes é demonstrada pela relação direta entre a interrupção da sinalização inibidora em modelos murinos com diversas doenças autoimunes ou respostas imunes exacerbadas (BOLLAND; RAVETCH, 2000; NISHIMURA et al., 1999; O'KEEFE et al., 1999; TANG et al., 2012; WATANABE et al., 2003; WILKINSON et al., 2002). Além disso, vários estudos em humanos descrevem a expressão diferencial e função alterada desses receptores em doenças autoimunes (LEBBINK et al., 2008; MACKAY et al., 2006; MONSIVÁIS-URENDA et al., 2007; OLDE NORDKAMP et al., 2011; RADSTAKE et al., 2004; YANG et al., 2008), e associações entre polimorfismos em genes que codificam esses receptores com autoimunidade (BARRETT et al., 2009; BRAUN-PRADO; PETZL-ERLER, 2007; FANCIULLI et al., 2007; GREGERSEN et al., 2009; VAN DER SLIK et al., 2003; STAHL et al., 2010).

Os receptores inibidores leucocitários podem ser divididos em dois grupos principais: os receptores da superfamília das imunoglobulinas (IgSR, do inglês *immunoglobulin supefamily receptors*) e os receptores inibidores semelhantes à lectina tipo-C. As células do sistema imune apresentam vários IgSR, que também incluem receptores ativadores, incluindo os transcritos semelhantes à imunoglobulina (ILTs do inglês *immunoglobulin-like transcript*), os receptores associados aos leucócitos semelhantes às imunoglobulinas (LAIR, do inglês *leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor*), os receptores das células NK (do inglês *natural killer*) semelhantes a imunoglobulina (KIR, do inglês *killer-cell immunoglobulin-like receptors*) e as lectinas semelhantes a imunoglobulinas ligantes de ácido siálico (Siglecs, do inglês *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*). Os genes *ILT*, *LAIR* e *KIR* estão localizados em um grande agrupamento denominado complexo receptor de leucócitos (LRC, do inglês *leukocyte receptor cluster*) localizado na região 19q13.4 (WAGTMANN et al., 1997), e os genes *Siglecs* estão próximos, dentro de uma região denominada LRC estendido (MUNITZ, 2010; MURPHY, 2014) (FIGURA 1).

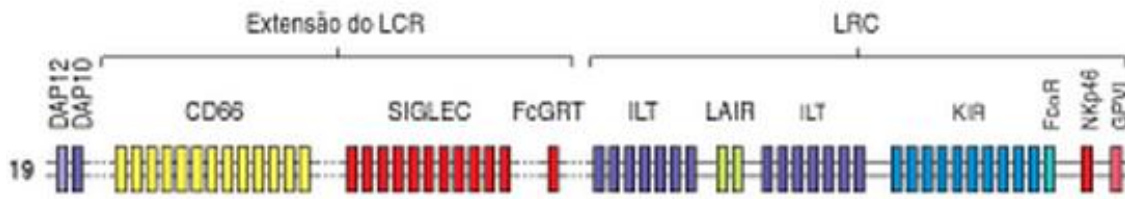


FIGURA 1 - REGIÃO DO LRC ESTENDIDO. FONTE: (MURPHY, 2014).

Os IgSR são caracterizados por um número variável de domínios semelhantes a Ig na porção extracelular, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática. Alguns IgSR perderam os domínios transmembrana e citoplasmático e são secretados, como o LAIR-2 (MEYAARD et al., 1997). As caudas citoplasmáticas dos IgSR inibidores possuem uma ou mais sequências ITIM (MARTIN et al., 2002). A fosforilação de resíduos tirosina nas ITIMs recruta principalmente as proteínas tirosinas fosfatases homólogas a Src1 (SHP-1, do inglês *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*) e/ou SHP-2, que inibem a transdução de sinais ativadores ao atuarem como antagonistas das tirosinas quinases e removerem fosfatos dos resíduos tirosina adicionados em outras moléculas de sinalização intracelular (MARTIN et al., 2002; MURPHY, 2014), ou ainda podem desfosforilar o próprio receptor como parte de um controle de feedback negativo (PAUL et al., 2000).

### 2.3. LAIR-1 e LAIR-2

#### 2.3.1. Estrutura das moléculas

Os receptores associados aos leucócitos semelhantes às imunoglobulinas (LAIR) são membros da superfamília das imunoglobulinas ligantes de colágeno, que pode ser transmembrana ou da matriz extracelular (MEYAARD et al., 2008; LEBBINK et al., 2006). LAIR-1 é um receptor inibidor expresso na maior parte das células do sistema imune. Sua expressão é detectada em precursores de células T, células T CD4+, T CD8+, células natural killer (NK), células B, monócitos (MEYAARD et al., 1997, 1999) e granulócitos (FLORIAN et al., 2006; VERBRUGGE et al., 2006b). LAIR-2 é um receptor solúvel que interage com os mesmos ligantes de LAIR-1, e portanto interfere com a função de LAIR-1. LAIR-2 é expresso em

células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*), células monocíticas e células T, mas células T CD4<sup>+</sup> são suas principais secretoras (LEBBINK et al., 2008).

Os dois receptores LAIR são caracterizados por conterem apenas um domínio semelhante a Ig tipo-C2 (similares a região constante das Igs) (MARTIN et al., 2002). Além desse domínio, LAIR-1 contém também um domínio transmembrana e dois motivos ITIMs na sua cauda citoplasmática (FIGURA 2). LAIR-2 é uma proteína secretada que apresenta 84% de similaridade de sequência de aminoácidos com LAIR-1, mas não possui os domínios transmembrana e citoplasmático (MEYAARD et al., 1997). Quando fosforilado por meio da ligação com colágenos, LAIR-1 recruta SHP-1 e SHP-2 (MEYAARD et al., 1997; VERBRUGGE et al., 2003; XU et al., 2000), mas a função inibidora de LAIR-1 também pode ocorrer independente dessas fosfatases (VERBRUGGE et al., 2006a).

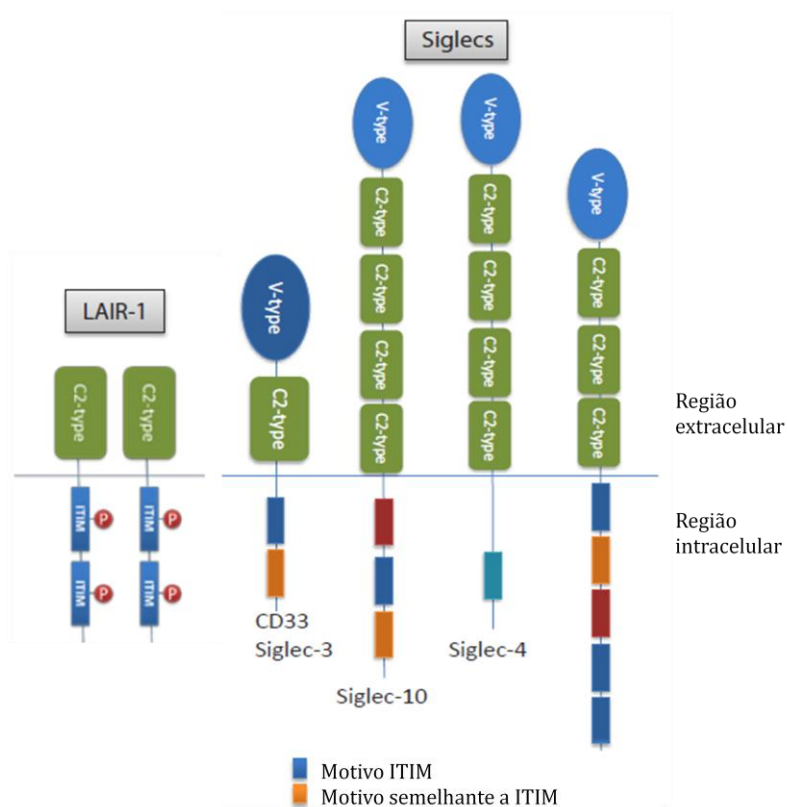


FIGURA 2 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DE ALGUNS RECEPTORES SIGLECS E LAIR-1. LAIR-1 CONTÉM UM DOMÍNIO SEMELHANTE A Ig TIPO-C2-1 EXTRACELULAR, E DOIS MOTIVOS ITIM NA SUA CAUDA CITOPASMÁTICA. NA PORÇÃO EXTRACELULAR, CD33 APRESENTA UM DOMÍNIO Ig TIPO-V TERMINAL, SEGUIDO POR UM DOMÍNIO Ig TIPO-C2. NA CAUDA CITOPASMÁTICA, CD33 POSSUI UM MOTIVO ITIM E UM MOTIVO SEMELHANTE A ITIM. FONTE: ADAPTADO DE THILIPAN THAVENTHIRAN (2012).

### 2.3.2. Genes e transcritos

Ambos os receptores são codificados por genes localizados no LRC. *LAIR1* ou CD305 (Entrez Gene ID 3903) possui 10 éxons e *LAIR2* ou CD306 (Entrez Gene ID 3904) possui 5 éxons. Os dois genes são transcritos em direções opostas, provavelmente em razão de uma duplicação inversa de um agrupamento ancestral de um gene *LAIR* com genes *ILT* (MEYAARD et al., 1997; WENDE et al., 2000).

*LAIR1* possui pelo menos seis variantes de RNAm (FIGURA 3). *LAIR-1a* (NM\_002287) e *LAIR-1b* (NM\_021706) codificam uma molécula transmembrana com um domínio semelhante a imunoglobulina tipo-C2 e dois motivos ITIMs na cauda citoplasmática. *LAIR-1b* não apresenta uma parte do domínio extracelular codificado pelo éxon 4 (região "*stalk*") e por isso tem 17 aminoácidos (aa) a menos do que *LAIR-1a*. Em células NK, a proteína *LAIR-1a* é preferencialmente expressa ao invés de *LAIR-1b*. Células T, ao contrário, aparentemente expressam mais *LAIR-1b* do que *LAIR-1a*. Estudos de citotoxicidade em células NK demonstram que essas duas isoformas não diferem funcionalmente, no entanto não se pode descartar a possibilidade que a falta desse segmento, que contém sítios de glicosilação, possa afetar a conformação do domínio extracelular e afetar a ligação de *LAIR-1* com seus ligantes (MEYAARD et al., 1999). *LAIR-1c* (RNAm NM\_001289023) é idêntico a *LAIR-1b*, exceto por uma mudança de aminoácido, e *LAIR-1d* (variante de RNAm ainda não validada pelo RefSeq) não possui o domínio intracelular (XU et al., 2000). A FIGURA 3 mostra outras isoformas de RNAm de *LAIR1* validadas pelo NCBI RefSeq.

*LAIR-2a* (NM\_021270.3) e *LAIR-2b* (NM\_002288.4) são duas variantes de recomposição alternativa de *LAIR2* (FIGURA 4). *LAIR-2b* não possui 17 aa em relação a *LAIR-2a*, assim como *LAIR-1b* em comparação com *LAIR-1a* (MEYAARD et al., 1999). O transcrito *LAIR2-c* (variante de RNAm ainda não validada pelo NCBI RefSeq) não possui 93 pb no éxon 3, codificando assim uma proteína com uma deleção de 31 aa em relação a *LAIR2-a* e *LAIR2-b*. Essa deleção inclui uma região envolvida na formação de pontes dissulfeto entre domínios e, assim, essa isoforma não possui um domínio Ig intacto (LEBBINK et al., 2008). A FIGURA 4 mostra outras isoformas de RNAm de *LAIR2* validadas pelo NCBI RefSeq.

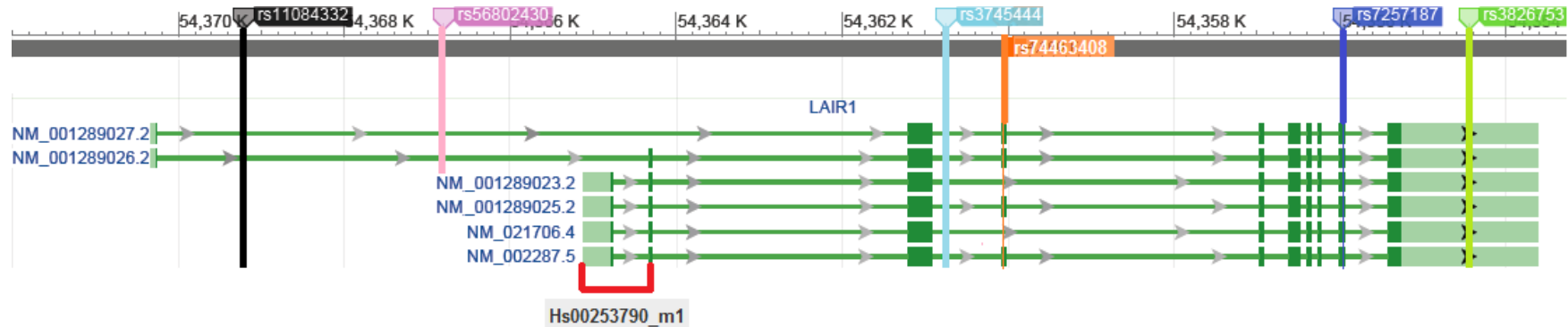


FIGURA 3. ESTRUTURA DAS SEIS VARIANTES DE *LAIR1* (CÓDIGOS INICIAM-SE COM NM\_), SNPs DE *LAIR1* INVESTIGADOS E ENSAIO TAQMAN HS00253790\_m1 UTILIZADO NESSE ESTUDO. O ENSAIO TAQMAN AMPLIFICA AS VARIANTES NM\_001289023, NM\_001289025, NM\_021706 (*LAIR1b*) E NM\_002287 (*LAIR1a*). FONTE: ADAPTADO DE NCBI ENTREZ GENE.

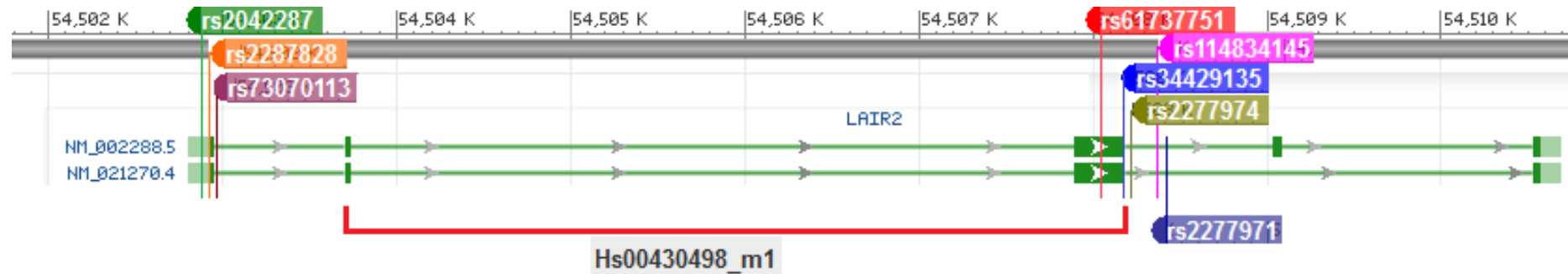


FIGURA 4. ESTRUTURA DAS DUAS VARIANTES DE *LAIR2* (CÓDIGOS INICIAM-SE COM NM\_), SNPs DE *LAIR2* INVESTIGADOS E ENSAIO TAQMAN HS00430498\_m1 UTILIZADO NESSE ESTUDO. O ENSAIO TAQMAN AMPLIFICA AS DUAS VARIANTES DE RNAm DE *LAIR2* VALIDADAS PELO REFSEQ (NM\_021270 - *LAIR2a*, E NM\_002288 - *LAIR2b*). FONTE: ADAPTADO DE NCBI ENTREZ GENE.

### 2.3.3. Função

LAIR-1 inibe a função de células NK (MEYAARD et al., 1997; POGGI et al., 1995), células T (MEYAARD et al., 1999), células B (VAN DER VUURST DE VRIES et al., 1999) e monócitos (POGGI et al., 1998).

Em monócitos, a ligação de LAIR-1 com anticorpo monoclonal específico previne a maturação dessas células em células dendríticas, ao inibir a sinalização de GSM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos) (POGGI et al., 1998).

Em células B, foi demonstrado que LAIR-1 tem um papel na diferenciação de proliferação celular, e inibe as funções dessas células *in vitro*. A ligação simultânea de LAIR-1 e receptor de células B (BCR) com ligantes reduz o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular que é induzido pela ligação de BCR, e assim inibe as funções dessas células (VAN DER VUURST DE VRIES et al., 1999).

Em células NK, LAIR-1 é capaz de inibir a lise das células-alvo, mesmo na presença de fortes sinais ativadores (MEYAARD et al., 1997), e inibir a produção de IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  por essas células. Assim como em células B, a interação de LAIR-1 com ligantes inibe o aumento do cálcio  $Ca^{2+}$  intracelular induzido por sinais advindos de moléculas ativadoras (POGGI et al., 1997).

Em células T, LAIR-1 inibe a proliferação e citotoxicidade de células T CD8+ e a proliferação e produção de citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  por T CD4+ (MEYAARD et al., 1999; POGGI et al., 1997; SAVERINO et al., 2002). No entanto, esse efeito é específico para algumas populações celulares e sob determinados sinais estimuladores. Foi demonstrado, por exemplo, que LAIR-1 inibe as funções de apenas certas populações de células T CD8+ efectoras (SAVERINO et al., 2002) (MEYAARD et al., 1999; POGGI et al., 1997). Além disso, o efeito inibidor sobre a citotoxicidade acontece apenas quando a ativação é realizada com anti-V $\beta$ , e não com anti-V $\gamma$  ou anti-CD3 (POGGI et al., 1997). No entanto, esses resultados não são concordantes com o estudo de Saverino et al. (2002), que demonstraram que LAIR-1 pode também inibir a ativação de células T CD8+ por anti-CD3. Também foi demonstrado que a maior densidade de LAIR-1 na superfície de células T CD8+ e CD4+ está diretamente relacionada com a inibição de funções celulares (SAVERINO et al., 2002).



#### 2.3.4. Expressão

A modulação da expressão de LAIR-1 em diferentes estágios de diferenciação celular ocorre em vários tipos celulares (MAASHO et al., 2005; VERBRUGGE et al., 2006b; VAN DER VUURST DE VRIES et al., 1999), e de modo geral a expressão do receptor diminui em células mais diferenciadas.

LAIR-1 é expresso em todas as fases do desenvolvimento de células B, mas os plasmócitos e aproximadamente metade da população de células B de memória não expressam o receptor. A estimulação de células B *naive* via CD40 ou BCR é acompanhada da diminuição da expressão de LAIR-1 na superfície celular (VAN DER VUURST DE VRIES et al., 1999).

Células *naive* T CD4+ e T CD8+ expressam mais LAIR-1 na superfície do que células efetoras e células T de memória (MAASHO et al., 2005; JANSEN et al., 2007). O efeito da estimulação celular na expressão de LAIR-1 em células T difere entre estudos. A ativação de células T com anti-CD3 e anti-CD28 (JANSEN et al., 2007) ou TNF- $\alpha$  (ZHANG et al., 2014) é acompanhada de uma menor expressão de LAIR-1 na superfície celular. A estimulação de células CD4+ Th1 e Th2 com TNF- $\alpha$  é acompanhada de menor expressão de LAIR-1 na superfície celular (ZHANG et al., 2014). Interessantemente, quando células T são ativadas com anti-CD3 e IL-2, a expressão do receptor LAIR-1 é aumentada (MAASHO et al., 2005). Análises *ex vivo* de células T antígeno-específicas demonstraram que a diminuição da expressão de LAIR-1 ocorre paralelamente à diminuição de CD127 (um marcador de células T de memória), demonstrando que a diminuição de LAIR-1 em resposta a ativação de células T pode também ocorrer *in vivo* (JANSEN et al., 2007). A regulação de LAIR-1 também está relacionada com a divisão celular, já que a expressão de LAIR-1 diminui após a primeira divisão celular de células T estimuladas (JANSEN et al., 2007).

A expressão de LAIR-1 também é regulada durante a maturação dos granulócitos. A expressão na superfície de eosinófilos parece ser constitutiva (FLORIAN et al., 2006; VERBRUGGE et al., 2006b), mas decai durante a maturação de neutrófilos. A estimulação de neutrófilos com citocinas, como TNF- $\alpha$  e GM-CSF, induz a expressão de LAIR-1 na superfície celular, indicando que LAIR-1 regula a função de neutrófilos maduros (VERBRUGGE et al., 2006b).

LAIR-1 está presente na superfície celular de blastos de pacientes com leucemia mielóide aguda, e alguns estudos demonstram que o receptor aparentemente tem função inibidora também nessas células. Foi demonstrado que a ligação de LAIR-1 leva à inibição da proliferação e indução da apoptose dos blastos leucêmicos através da inibição de fator de estimulação de colônia de granulócitos-monócitos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) (ZOCCHI et al., 2001) e inibição de NF- $\kappa$ B (POGGI et al., 2000). No entanto, um estudo recente demonstrou que a deleção de LAIR-1 bloqueia o desenvolvimento das células cancerígenas em camundongos e resulta na apoptose de células cancerígenas *in vitro*, e interessantemente não afeta a hematopoiese de células normais (KANG et al., 2015).

Como LAIR-1 é um receptor expresso na maior parte das células do sistema imune, e seus ligantes são abundantes, a interação receptor-ligante precisa ser muito bem regulada para que ocorra um balanço correto das respostas imunes. Em condições fisiológicas, as células do sistema imune no sangue não têm contato com colágenos da matriz extracelular, mas quando passam a barreira hematopoiética e alcançam um tecido (que pode estar ou não danificado), essas células entram em contato com seus ligantes da matriz, o que aumenta o *threshold* para ativação dessas células (LEBBINK et al., 2006). Portanto, num primeiro momento a força dos sinais ativadores determina se a ligação de LAIR-1 resultará em sinais capazes de inibir esses sinais ativadores (MEYAARD, 2008). Nesse caso, a disponibilidade de colágeno serve como modulador da atividade inibidora regulada por LAIR-1 (LEBBINK et al., 2006).

Os colágenos já foram implicados em diversas doenças autoimunes (LEBBINK et al., 2006). O colágeno II, por exemplo, é um autoantígeno em artrite reumatóide e em lúpus eritematoso sistêmico (GIOUD et al., 1982). O colágeno XVII, ligante de LAIR-1, é um autoantígeno em doenças autoimunes bolhosas, como o penfigóide bolhoso (FRANZKE et al., 2005), PV e PF (PAUS et al., 2006). No penfigóide bolhoso, a ligação desses anticorpos afeta as funções adesivas do colágeno e participa do processo de formação das bolhas epidérmicas (FRANZKE et al., 2005). A ligação desses autoanticorpos com colágenos poderia também afetar a ligação com LAIR-1, e assim participar da patologia dessas doenças (LEBBINK et al., 2006). C1q, o primeiro componente do sistema complemento que está depositado no espaço intercelular em lesões de PV (VAN JOOST et al., 1972;

JORDON, 1980) também é um ligante de LAIR-1, e foi demonstrado que sua interação com o receptor resulta em inibição da diferenciação de monócitos em células dendríticas (DCs) e supressão de produção de IFN- $\alpha$  por células dendríticas (SON et al., 2012; SON; DIAMOND, 2015).

Além da disponibilidade de ligantes, a interação de LAIR-1 e colágenos pode ser regulada a nível da expressão do próprio receptor (MEYAARD, 2008). A deficiência da expressão de receptores inibidores pode resultar em hiperatividade do sistema imune, como acontece com diversas doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (LEBBINK et al., 2006). Em lúpus eritematoso sistêmico, os linfócitos B têm expressão deficiente de LAIR-1 na superfície celular, o que resulta em uma menor inibição da produção de anticorpos por essas células (COLOMBO et al., 2012). Na mesma doença é observada menor expressão de LAIR-1 na superfície de células dendríticas plasmacitóides, e essa expressão deficiente está diretamente relacionada com maior produção de IFN- $\alpha$ . Através da produção dessa citocina, essas células ativam múltiplos mecanismos efetores, incluindo células T, B e NK (BONACCORSI et al., 2010). LAIR-1 é altamente expresso na superfície de macrófagos e monócitos presentes no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, e menos expresso em células T CD4+ de pacientes com artrite reumatoide em relação a pessoas saudáveis. (ZHANG et al., 2014). Pacientes de PV, ao contrário, expressam 1,7 vez mais *LAIR1* a nível de RNAm em células T CD4+ o que em pessoas saudáveis (MALHEIROS et al., 2014).

A expressão de LAIR-1 e LAIR-2 solúveis também regula a atividade inibidora de LAIR-1 (LEBBINK et al., 2006). LAIR-2 é um receptor que liga colágenos e, ao competir pelos mesmos ligantes, regula o potencial inibidor de LAIR-1 (LEBBINK et al., 2008). Por exemplo, foi demonstrado que LAIR-2 inibe sinais inibidores emitidos por LAIR-1 quando este interage com C1q (SON et al., 2012). Como LAIR-2 liga colágenos com uma afinidade maior do que LAIR-1 (OLDE NORDKAMP et al., 2011), uma pequena variação de expressão proteica de LAIR-2 já é suficiente para causar um grande impacto na regulação das respostas imunes.

Os níveis de LAIR-2 são aumentados em doenças autoimunes da tireoide (doença de Graves e tireoidite autoimune) (SIMONE et al., 2013), e no fluido sinovial (LEBBINK et al., 2008), urina e plasma (OLDE NORDKAMP et al., 2011) de pacientes com artrite reumatoide, uma doença autoimune caracterizada pela inflamação crônica das articulações. Os níveis elevados de LAIR-2 na urina desses

pacientes é significativamente correlacionado com marcadores de inflamação (OLDE NORDKAMP et al., 2011). Assim, LAIR-2 funciona como um mediador proinflamatório ao diminuir o potencial inibidor de LAIR-1, o que resulta em células proinflamatórias altamente ativadas, característica de doenças autoimunes como a artrite reumatóide (LEBBINK et al., 2008).

LAIR-2 inibe a ativação e agregação de plaquetas (LENTING et al., 2010). Como já foi mencionado, LAIR-2 está presentes em níveis mais elevados no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (LEBBINK et al., 2008), e já foi demonstrado que micropartículas derivadas de plaquetas contribuem para a patogênese de artrite inflamatória via receptor de colágeno GpVI (BOILARD et al., 2010). Assim, Lenting et al. (2010) sugeriram que LAIR-2 secretado localmente por células T CD4<sup>+</sup> efectoras poderiam modular a progressão da doença mediada por GpVI. LAIR-2 também inibe as vias clássicas e da lectina do sistema complemento, ao se ligar com C1q e MBL, inibir a fixação de C4 a IgG ou manose, reduzir a ativação de C4 por IgG agregado e inibir a deposição de iC3b em células (OLDE NORDKAMP et al., 2014).

A isoforma solúvel de LAIR-1 também regula o potencial inibidor de LAIR-1 transmembrânico. Assim como LAIR-2, a expressão de LAIR-1 solúvel também é aumentada na urina (OLDE NORDKAMP et al., 2011), fluido sinovial e plasma (OLDE NORDKAMP et al., 2011; ZHANG et al., 2013a) de pacientes com artrite reumatóide. Aparentemente, no entanto, LAIR-2 é um antagonista de LAIR-1 muito mais potente do que LAIR-1 solúvel (OLDE NORDKAMP et al., 2011), mas isso não é consenso (ZHANG et al., 2013a). Como citado anteriormente, sob estimulação *in vitro* com TNF- $\alpha$ , as células Th1 e Th2 expressam menos LAIR-1 de membrana (ZHANG et al., 2014). Receptores transmembrana podem ser secretados na circulação na forma solúvel quando células são ativadas, e isso acontece com diversos receptores. Assim, os autores sugeriram que LAIR-1 transmembrana é clivado por proteases sob estimulação de células T CD4<sup>+</sup>, e por essa razão o nível de LAIR-1 diminui e o nível solúvel de LAIR-1 aumenta sob estimulação celular (ZHANG et al., 2013a; ZHANG et al., 2014). No entanto, ao contrário de LAIR-2 que é secretado principalmente por células T CD4<sup>+</sup>, ainda não se sabe a origem de LAIR-1 solúvel (OLDE NORDKAMP et al., 2011).

## 2.4. CD33

CD33 faz parte da família dos Siglecs - lectinas semelhantes a imunoglobulinas ligantes de ácido siálico. Os Siglecs consistem em uma família de receptores transmembrana ligantes de ácidos siálicos (que se encontram livres ou em superfícies celulares). Esses receptores inibidores são caracterizados pela presença de um domínio semelhante a Ig tipo-V (um domínio similar a região variável das Ig) amino-terminal que se liga ao ácido siálico, e por um número variável (entre 1 e 16) de domínios semelhantes a Ig tipo-C2 conectados via domínio transmembrana a uma cauda citoplasmática que contém um ou mais ITIMs ou motivos semelhantes a ITIM (CROCKER et al., 2007) (FIGURA 2).

Atualmente, são conhecidos 14 tipos de Siglecs em humanos, que podem ser divididas em dois grupos segundo a similaridade de sequência nucleotídica e localização genômica (CROCKER et al., 2012; MACAULEY et al., 2014). Os genes *SIGLEC1* (sialoadesina), *CD22* ou *SIGLEC2*), *MAG* ou *SIGLEC4* (glicoproteína associada à mielina) e *SIGLEC15* são extremamente conservados em todas as espécies de mamíferos já analisadas. Os outros dez Siglecs (*CD33*, *SIGLEC5* a *SIGLEC11*, *SIGLEC14* e *SIGLEC16*) são intimamente relacionados entre si por mostrar grande homologia ao *CD33*, e formam um agrupamento localizado no cromossomo 19q13.4 entre o cluster de genes *CD66* e o LRC (MACAULEY et al., 2014; YOUSEF et al., 2002).

### 2.4.1. Genes, transcritos e estrutura do receptor

A molécula Siglec-3 (CD33) é codificada pelo gene *CD33* ou *SIGLEC3* (Entrez Gene ID 945). O gene está localizado na região 19q13.4, no agrupamento dos *Siglecs* no LRC estendido (PEIPER et al., 1988; ENTREZ GENE ID 945) (FIGURA 1). *CD33* possui 8 éxons (FIGURA 5). O primeiro éxon codifica o peptídeo sinal, e o domínio Ig tipo-V é codificado pelo segundo éxon. O domínio Ig tipo-C2 é codificado pelo éxon 3, e o éxon 4 codifica um segmento *linker*. O éxon 5 codifica a porção transmembrânica da proteína, e a porção citoplasmática é codificada pelos éxons 7 e 8, sendo que o último codifica os imunorreceptores citoplasmáticos ITIM e semelhante a ITIM (YOUSEF et al., 2002).

Três variantes de RNAm são validadas pelo NCBI RefSeq (FIGURA 5). A maior das isoformas proteicas de *CD33*, CD33M (NP\_001763.3) contém 364 aminoácidos, 67 kDa e é codificada pela variante 1 de RNAm (NM\_001772.3, 1466 pb) (PEIPER et al., 1988; SIMMONS e SEED, 1988; NCBI RefSeq). CD33M contém dois domínios extracelulares Ig e dois motivos – ITIM e tipo-ITIM - no seu domínio citoplasmático (FIGURA 2). O RNAm da segunda variante de *CD33* (*CD33m*) é gerado a partir de recomposição alternativa. A exclusão do éxon 2 (que codifica o domínio Ig V ligante de ácido siálico) resulta em um transcrito mais curto (NM\_001082618.1, 1085 pb) e em uma proteína também menor (NP\_001076087, 237 aminoácidos, 38 kDa) (HERNÁNDEZ-CASELLES et al., 2006; PÉREZ-OLIVA et al., 2011; NCBI RefSeq). O RNAm precursor da isoforma 3 difere na região 3' UTR e na região codificadora em comparação a maior variante, pois apresenta um éxon terminal alternativo e uma região 3' UTR mais curta. Ambos RNAm (NM\_0011776008.1, 1108 pb) e proteína (310 aminoácidos, NP\_001171079) da isoforma 3 são menores que aqueles de CD33M, porém maiores que CD33m (NCBI RefSeq).

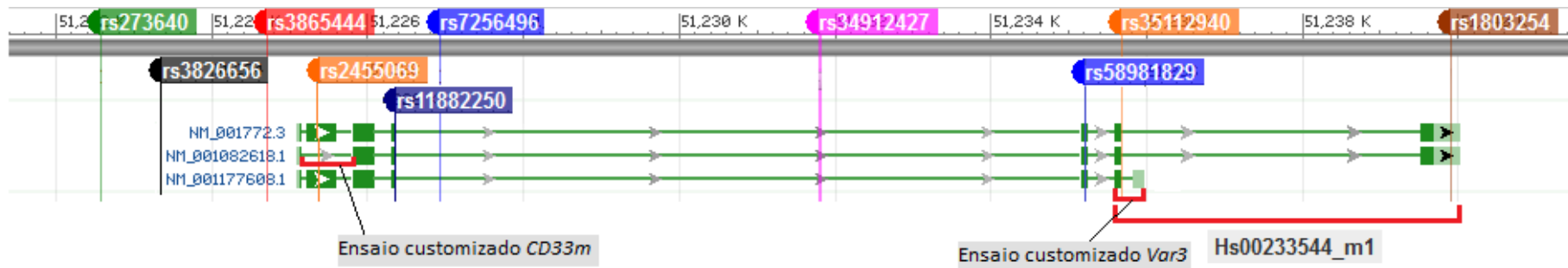


FIGURA 5. ESTRUTURA DAS TRÊS VARIANTES DE *CD33* (CÓDIGOS INICIAM-SE COM NM\_), SNPs DE *CD33* INVESTIGADOS E ENSAIOS TAQMAN UTILIZADOS NESSE ESTUDO. O ENSAIO TAQMAN Hs00233544\_m1 UTILIZADO AMPLIFICA AS VARIANTES DE RNAm NM\_001772 (*CD33M*) E NM\_001082618 (*CD33m*). UM DOS ENSAIOS CUSTOMIZADOS AMPLIFICA A VARIANTE NM\_001082618 (*CD33m*) E O OUTRO AMPLIFICA A VARIANTE *Var3* (NM\_001177608). FONTE: ADAPTADO DE NCBI ENTREZ GENE.

#### 2.4.2. Função e expressão

CD33 medeia interações celulares através da sua ligação com agentes sialados em superfícies celulares e por meio dos motivos ITIM e semelhante a ITIM (FREEMAN et al., 1995; COWAN et al., 2013; TAYLOR et al., 1999). CD33 também tem sua atividade regulada por SOCS3 (proteína supressora da sinalização de citocinas 3), que compete com SHP-1 e SHP-2 e liga-se aos motivos ITIM e tipo-ITIM fosforilados, resultando na degradação proteossômica de CD33 em respostas inflamatórias (ORR et al., 2007). Além da fosforilação em tirosinas, CD33 também é fosforilado em resíduos serina pela proteína quinase C, e essa sinalização pode regular a atividade de CD33. No entanto, esse mecanismo ainda não foi bem elucidado (COWAN et al., 2013).

CD33 é expresso a partir do início do desenvolvimento das células mieloides em precursores mieloides multipotentes, continua a ser expresso durante o desenvolvimento mielomonocítico, e é negativamente regulado ao longo da maturação dos granulócitos. A expressão em monócitos, macrófagos residentes (tais como as células de Kupffer no fígado), neutrófilos e células dendríticas é constitutiva (PEIPER et al., 1988; BERNSTEIN, 2002; VAN LOCHEM et al., 2004; NGUYEN et al., 2006; HERNÁNDEZ-CASELLES et al., 2006; HOYER et al., 2008; PÉREZ-OLIVA et al., 2011).

A maior parte das funções de CD33 foi descrita em células mieloides. Um dos primeiros estudos a evidenciar a função inibidora de CD33 foi realizado nessas células, nas quais CD33 regula negativamente a mobilização de cálcio induzida por CD64, um receptor ativador ligante de IgG de alta afinidade (PAUL et al., 2000).

CD33 também regula o crescimento e sobrevivência celulares. O tratamento com mAbs (anticorpos monoclonais) anti-CD33 previne a maturação de monócitos humanos em células dendríticas (FERLAZZO et al., 2000) e a diferenciação e proliferação de células mieloides normais e blastos leucêmicos de pacientes com LMA através da inibição da proliferação celular e indução da apoptose (VITALE et al., 1999).

A redução da expressão de CD33 em monócitos obtida através de tratamento com anticorpos específicos ou utilizando RNA de interferência resulta no aumento da secreção de citocinas pro-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8. Os autores também



demonstraram que a ativação dos monócitos é acompanhada por uma diminuição da expressão proteica de CD33 (LAJAUNIAS et al., 2005).

Em monócitos, a variação da expressão de CD33 parece estar relacionada com a migração celular, como demonstraram Grisar et al., (2001). Os autores caracterizaram o imunofenótipo de monócitos migrantes através de camadas unicelulares de células endoteliais e verificaram que a migração de monócitos induz mudanças que são consistentes com o fenótipo de células ativadas, e essas mudanças incluem a superexpressão de CD33, diferentemente do que foi relatado por Lajaunias et al. (2005).

CD33, como os outros membros da família das Siglecs, promove a adesão celular dependente de ácido siálico. Taylor et al., (1999) investigaram a adesão de eritrócitos em células COS que expressavam CD33. Os autores demonstraram que a fosforilação de CD33 diminui com o aumento da adesão celular, e que a adesão celular aumenta quando as tirosinas da cauda citoplasmática de CD33 são mutadas ou deletadas.

Além de funções inibidoras, CD33 apresenta uma função endocítica que permite que a molécula participe da proteção do organismo contra patógenos (COWAN et al., 2013). A fosforilação de tirosinas na cauda citoplasmática de CD33 aumenta a endocitose de anticorpos anti-CD33, assim como mutações nos mesmos aminoácidos reduzem a internalização desses anticorpos (WALTER et al., 2008). A função endocítica das Siglecs vem sendo explorada por pesquisadores na busca de terapias celulares para o tratamento da leucemia mieloide aguda, doença na qual CD33 é um dos marcadores (BORTHAKUR, 2013; BUCKLEY; WALTER, 2015; COWAN et al., 2013).

CD33 tem expressão induzida em células linfoides, tais como células T ativadas, células natural killer e células B, sugerindo um papel da molécula na resposta imune adaptativa (HERNÁNDEZ-CASELLES et al., 2006). Em 1998, Dworzak e colaboradores detectaram, através de citometria de fluxo, a presença de CD33 na superfície de células TdT+ (deoxinucleotidil-transferase terminal) CD19-CD79a+, que são as células precursoras primordiais da linhagem de linfócitos B (DWORZAK et al., 1998). CD33 também foi identificado em uma subpopulação de células B CD19+ do sangue periférico de pacientes com a doença de Behcet (EKŞIOGLU-DEMIRALP et al., 1999).

Linfócitos T CD33+ foram descritos em alguns poucos estudos. Em 1994, Nakamura e colaboradores detectaram a expressão de CD33 em linfócitos T CD4+ e CD8+ ativados com mAb anti-CD33 e interleucina-2 (NAKAMURA et al., 1994). Schmidt-Wolf et al. (1995) conseguiram expandir células CD3+CD33+ de pacientes de leucemia mieloide e de indivíduos saudáveis através da estimulação com diversas citocinas e mAb anti-CD3, e concluíram que essas células T CD3+CD33+ existiam em condições normais no sangue periférico de indivíduos saudáveis. (HERNÁNDEZ-CASELLES et al., 2006) detectaram, por meio de várias abordagens, CD33 a nível de RNAm e proteína em células T e NK ativadas por aloantígenos. Os DNAs de CD33 em ambas as linhagens linfoides e mieloides se mostraram idênticos, no entanto a proteína CD33 linfoide tinha menor peso molecular, o que sugere que essas moléculas sofrem modificações pós-transcricionais (HERNÁNDEZ-CASELLES et al., 2006). Células T CD33+ induzidas a partir de ativação policlonal de células T isoladas de sangue periférico parecem possuir um papel regulatório, e secretam altos níveis de IL-4, baixos níveis de IFN $\gamma$ , e inibem a proliferação de células T *naive*. Além disso, essas células expressam marcadores relacionados à células T reguladoras (Treg) (NOVAK, 2008; VOLOSHIN-SELA, 2009). Em um estudo que buscou identificar genes específicos do fenótipo de Treg, Probst-Kepper et al. (2009) demonstraram que essas células expressam CD33. Além disso, CD33 é expresso em altos níveis na superfície de um subgrupo de células T CD4+ efectoras (derivadas de T CD4+CD25- estimuladas com anti-CD3/-CD28/IL-2), que também apresentam altos níveis de FOXP3.

Os transcritos e isoformas proteicas de CD33 se expressam diferencialmente - CD33m é mais expresso em células NK e células mieloides, e pouco expresso em linfócitos T e B (HERNÁNDEZ-CASELLES et al., 2006; PÉREZ-OLIVA et al., 2011). A expressão diferencial das duas isoformas nas diferentes células e a presença de ambas na superfície celular sugere que CD33m e CD33M estão relacionadas com a regulação das células hematopoiéticas. Além disso, a presença de CD33 em ambas as linhagens linfoide e mieloide sugere que o receptor pode estar envolvido na regulação das respostas imune inata e adaptativa (HERNÁNDEZ-CASELLES et al., 2006). Malik et al. (2013) e Raj et al. (2014), no entanto, propuseram que CD33m é uma molécula não-funcional, já que não possui o domínio ligante de ácido siálico.

A expressão aberrante de CD33 está correlacionada com diversos tipos de fenótipos, predominantemente com alguns tipos de câncer e com a doença de

Alzheimer. CD33 está presente na superfície dos blastos malignos de aproximadamente 90% dos pacientes de leucemia mieloide aguda (LMA) (MATUTES et al., 1985; GRIFFIN et al., 1984; BERNSTEIN, 2002; SPERR et al., 2005), e é significativamente mais expresso nos mastócitos e células multipotentes CD34+CD38- desses pacientes em comparação com células de indivíduos saudáveis (KRAUTH et al., 2007; HERRMANN et al., 2012). Pollard e colaboradores (2012) verificaram que a maior expressão de CD33 em blastos malignos está diretamente associada com piores prognósticos de LMA. Além disso, a maior expressão da forma proteica de CD33 também está relacionada com maior susceptibilidade à LMA (MORTLAND et al., 2013).

Além da LMA, a expressão proteica aumentada de CD33 também está relacionada a outros tipos de neoplasmas mieloides (JILANI et al., 2002), e esse aumento é frequentemente associado ao maior número de células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSC, do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) (LIU et al., 2010; DONG et al., 2013). As MDSCs constituem aproximadamente 0,5% das células mononucleares do sangue periférico e consistem em uma população heterogênea que contém células progenitoras mieloides e células mieloides imaturas. Essas células são definidas como CD33+HLA-DR- e linhagem (CD3, CD19, CD56) negativas. MDSCs são importantes supressoras das respostas imunes inatas e adaptativas (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009), e além do câncer, sua expansão está diretamente relacionada com autoimunidade e respostas inflamatórias. Essas células são abundantes no sangue de pacientes com esclerose múltipla (IOANNOU et al., 2012), em encefalomielite autoimune experimental (ZHU et al., 2007), uveoretinite autoimune experimental (KERR et al., 2008), e na doença inflamatória intestinal (HAILE et al., 2008). Essas células também previnem diabetes tipo I em murinos (YIN et al., 2010). Essas evidências sugerem, portanto, um papel indireto de CD33 no controle das respostas imunes e na autoimunidade.

A expressão de CD33 também está diretamente relacionada à doença de Alzheimer. Diversos estudos demonstram que a maior expressão de CD33 em monócitos e no cérebro de pacientes com Alzheimer (em nível de RNAm e proteína) está relacionada com maior susceptibilidade à doença, maior comprometimento cognitivo e com maiores níveis de  $\beta$ -amiloide no cérebro dos indivíduos afetados (BRADSHAW et al., 2013; GRICIUC et al., 2013; KARCH et al., 2012). No entanto, a diferença de expressão entre as isoformas de CD33 é que caracteriza a importância

do receptor na patogênese da doença. Monócitos com maior expressão de CD33M possuem menor capacidade fagocítica do que os monócitos com maior expressão de CD33m. Isso porque CD33M é uma molécula funcional e CD33m, ao contrário, é uma molécula não funcional por não conter o domínio Ig tipo-V ligante de ácido siálico e, assim, não reprime as funções monocíticas como o faria CD33M (MALIK et al., 2013; RAJ et al., 2014). Portanto, as células com maior expressão de CD33M têm menor capacidade de fagocitar  $\beta$ -amiloide, o que acaba causando um aumento do número de macrófagos e células da micróglia ativadas (porém menos funcionais) no cérebro, aonde as mesmas falham em fagocitar as placas neuríticas amiloides características de Alzheimer (MALIK et al., 2013; BRADSHAW et al., 2013; GRICIUC et al. 2013; RAJ et al., 2014) .

CD33 está relacionado com o quadro inflamatório presente em pacientes com diabetes tipo 2. Monócitos de pacientes cultivados com altos níveis de glicose expressam menos CD33 (em nível de proteína e RNAm) e secretam maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-12p70 (GONZALEZ et al., 2012). Na doença pulmonar crônica obstrutiva, a superexpressão de CD33 em granulócitos está negativamente associada com o nível de gravidade da doença: nessa doença, CD33 tem o potencial de inibir a inflamação e prevenir danos teciduais (ZHANG et al., 2013b). Na artrite reumatoide, células dendríticas no fluido sinovial de pacientes expressam altos níveis de CD33, relacionados com o maior grau de diferenciação dessas células (THOMAS; QUINN, 1996).

#### 2.4.3. CD33 e pênfigo

Malheiros et al. (2014), em estudo de expressão gênica global, verificaram que linfócitos T CD4+ de pacientes com a forma generalizada do pênfigo foliáceo sem tratamento imunossupressor expressam 3,3 vezes mais *CD33* em comparação com os linfócitos de controles, e o gene é 2,7 vezes mais expresso em linfócitos T CD4+ de pacientes com forma generalizada do pênfigo foliáceo em relação aos linfócitos de pacientes com a forma localizada da doença. Dey-Rao et al. (2013) realizaram uma análise de expressão gênica global em PV. Os autores encontraram uma maior expressão de *CD33* (razão de expressão 1,94;  $p=0,038$ ) em PBMC de pacientes com lesão ativa em comparação com pacientes em remissão sem tratamento. Kalantari-Dehaghi et al. (2011, 2013) demonstraram que CD33 é alvo de

autoanticorpos no PV. Os autores avaliaram o perfil de autoanticorpos de pacientes de PV por meio de microarranjos de peptídeos, e demonstraram que CD33 reage mais significativamente com o soro de pacientes com PV em relação ao soro de indivíduos saudáveis. No estudo mais recente, os autores realizaram uma análise de especificidade para identificar os autoantígenos reconhecidos por anticorpos de PV, e verificaram que CD33 é reconhecido pelos anticorpos de indivíduos com PV com uma frequência 27,7 vezes maior que de controles. Notavelmente, CD33 é o autoantígeno mais específico (autoantígeno reconhecido pelos anticorpos de PV com frequência que excedeu aquela dos controles por pelo menos 10 vezes) entre todas as 701 proteínas testadas. Associações com polimorfismos genéticos de *CD33* também já foram descritas em PF. Cruz (2013), em uma amostra de 158 pacientes e 141 controles saudáveis de ascendência predominantemente europeia, demonstrou que o alelo *rs2455069 G* exerce proteção a seus portadores (OR=0,40;  $p=0,0002$ ), e *rs1803254 C* é um alelo de susceptibilidade (OR=1,86;  $p=0,002$ ). O SNP *rs11882250* também foi analisado nesse estudo, mas não foi encontrada associação com o PF.

### 3. HIPÓTESES E JUSTIFICATIVAS

Nesse estudo, levantamos a hipótese de que a expressão dos genes *CD33*, *LAIR1* e *LAIR2* varia entre indivíduos saudáveis e que existem polimorfismos relacionados a alterações da expressão gênica. A importância desses genes para a regulação das respostas imunes está amplamente relatada na literatura. Além disso, a expressão alterada de *LAIR1* e *CD33* em células CD4+ circulantes de pacientes de pênfigo e associações de SNPs com PF foram demonstradas em estudos realizados pelo nosso grupo. Portanto, sugerimos também que os níveis de expressão de RNAm e polimorfismos genéticos desses genes interferem na susceptibilidade ao pênfigo. Ao caracterizar a variação genética e a variação de expressão desses genes em amostras da população saudável e de pacientes de pênfigo, contribuiremos para o entendimento da patogênese dessa doença multifatorial, e também para o entendimento do papel desses genes na autoimunidade de maneira mais abrangente.

#### 4. OBJETIVOS

Um dos objetivos gerais deste estudo é verificar se a expressão diferencial dos genes *LAIR1*, *LAIR2* e *CD33* interfere na susceptibilidade ao pênfigo foliáceo. Ainda, pretendemos melhorar o entendimento dos mecanismos etiopatogênicos do pênfigo foliáceo através de um estudo de associação caso-controle com polimorfismos destes genes e contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos no controle da expressão gênica.

Os objetivos específicos são:

- Analisar os diferentes níveis de expressão de RNAm dos genes *LAIR1*, *LAIR2* e *CD33* em indivíduos saudáveis e em pacientes de PF.
- Verificar a existência de SNPs que são marcadores dos níveis de expressão diferencial dos genes *LAIR1*, *LAIR2* e *CD33*.
- Verificar se os polimorfismos de *LAIR1*, *LAIR2* e *CD33* interferem na susceptibilidade ao PF.
- Investigar as possíveis causas das associações encontradas analisando os possíveis SNPs funcionais por meio de ferramentas de bioinformática.

## 5. ARTIGOS

### **LAIR2 POLYMORPHISMS MARK DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION LEVELS AND INFLUENCE SUSCEPTIBILITY TO PEMPHIGUS**

#### **Authors and Affiliations**

Carolina Maciel Camargo<sup>1</sup>, Danillo Gardenal Augusto<sup>1</sup>, Maria Luiza Petzl-Erler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Human Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

#### **Corresponding author**

Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler  
Departamento de Genética  
Universidade Federal do Paraná  
Caixa Postal 19071  
81531-990  
Curitiba, Brazil  
Tel: (+5541) 3361-1746  
perler@ufpr.br

**Acknowledgments:** We thank the patients and healthy controls for volunteering for this study, and the staff of the Hospital Adventista do Pênfigo and of the Banco de Sangue do Hospital de Clínicas from the Federal University of Paraná for their support. We also thank Gabriel Adelman Cipolla and Liana Alves de Oliveira for the technical and intellectual input for this work. This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação Araucária and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank CNPq CAPES for the research fellowships granted for all authors, in especial the Science without Borders Program for the Young Talent Fellowship awarded for the second author.



## ABSTRACT

LAIR-1 is a collagen-binding inhibitory receptor important for the regulation of immune responses expressed on the majority of peripheral blood mononuclear cells. LAIR-2 is a soluble homolog that antagonizes LAIR-1 inhibitory function by binding the same ligands. We sought to investigate whether *LAIR1* and *LAIR2* single nucleotide polymorphisms (SNP) are associated with differential mRNA expression levels. We analysed 14 SNPs of *LAIR1* (6) and *LAIR2* (8) by mass spectrometry-based genotyping and extracted mRNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 177 subjects, which was evaluated by quantitative gene expression analyses. Four SNPs of *LAIR1* and two SNPs of *LAIR2* mark differential mRNA expression levels. In order to verify the biological relevance of these findings, we analysed additional 515 individuals (282 patients and 233 controls) to check if *LAIR1* and *LAIR2* differential mRNA expression influences susceptibility to pemphigus foliaceus (PF), an autoimmune blistering skin disease endemic in Brazil. Two *LAIR1* SNPs (*rs56802430* G, OR=1.52,  $p=0.0329$ ; *rs11084332* C, OR=0.57,  $p=0.0022$ ) and one *LAIR2* (*rs2287828* T+, OR=1.9,  $p=0.0097$ ) contribute to differential susceptibility to PF. Furthermore, we demonstrate interactions among four *LAIR2* SNPs (*rs2042287*, *rs2287828*, *rs2277974* and *rs114834145*). A haplotype harbouring these SNPs is strongly associated with higher *LAIR2* mRNA levels (2.10-fold,  $p=0.007$ ) and with higher susceptibility to PF (OR=4.12,  $p=0.0008$ ). We suggest that *LAIR1* and *LAIR2* genetic variants are associated with regulation of gene expression and variable PF susceptibility, and that *LAIR2* differential mRNA expression influences PF pathogenesis. Our data demonstrate how this relatively unknown disease can add invaluable knowledge regarding the role of *LAIR1* and *LAIR2* in immune responses.

**Keywords:** *LAIR1*, *LAIR2*, disease, pemphigus foliaceus, autoimmunity, genetic susceptibility.

## INTRODUCTION

LAIR-1 and LAIR-2 are receptors of the immunoglobulin (Ig) superfamily. LAIR-1 is a transmembrane glycoprotein expressed on the majority of human peripheral blood leukocytes. It contains one Ig C2-set domain and two immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM) in its cytoplasmic tail that promote recruitment and activation of Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1/2 (SHP-1/SHP-2) and leads to inhibition of downstream events associated with cellular activation (Meyaard et al. 1997;

Sathish et al. 2001)(Meyaard et al. 1997). LAIR-2 is a secreted receptor mainly produced by T CD4+ cells, that shows ~84% of amino acid sequence similarity to LAIR-1 but lacks the intracellular and transmembrane domains (Meyaard et al. 1997; Lebbink et al. 2008). Crosslinking of LAIR-1 suppresses function and/or differentiation of NK cells (Meyaard et al. 1997), T cells (Meyaard et al. 1999; Saverino et al. 2002; Jansen et al. 2007), B cells (van der Vuurst de Vries et al. 1999; Merlo et al. 2005), dendritic cells precursors (Bonaccorsi et al. 2010) and its precursors (Poggi et al. 1998), and monocytes (Son et al. 2012; Son and Diamond 2015) and plasmacytoid dendritic cells (Bonaccorsi, 2010). LAIR-2 regulates the inhibitory potential of LAIR-1 by binding the same ligands (Lebbink et al. 2008).

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune blistering skin disease characterized by the presence of IgG4 autoantibodies (Rock et al. 1989) specific to desmoglein (DSG) 1 (Stanley *et al.* 1986), one of the major components of desmosomes. Blistering occurs by detachment of the upper layers of the epidermis by a process called acantholysis. PF has an endemic form in Brazil (known as "fogo selvagem" or wild fire), that is thought to be triggered by exposure to one or more unknown environmental factors (Diaz et al. 1989a). PF patients present abnormalities in several immune cell populations (Santi and Sotto 2001; Warren et al. 2003, unpublished results from our group) but a hallmark of the disease is the presence of DSG-1 specific T lymphocytes, and a predominant Th2 cytokine pattern in the cytokine inflammatory infiltrate of lesions (Lin et al. 2000).

Altered protein levels of LAIR-1 and LAIR-2 have been associated with several autoimmune disorders and inflammatory responses, such as systemic lupus erythematosus (SLE) (Bonaccorsi et al. 2010; Colombo et al. 2012), rheumatoid arthritis (RA) (Lebbink et al. 2008; Olde Nordkamp et al. 2011) and autoimmune thyroid diseases (Grave's and autoimmune thyroiditis) (Simone et al. 2013). *LAIR1* and *LAIR2* genes are located at the chromosome 19 (19q13.4) within the leukocyte receptor complex (LRC) (Meyaard et al. 1997; Wagtmann et al. 1997). This region also contains the *KIR* cluster, a gene family previously studied in several Brazilian populations (Rudnick et al. 2008; Jobim et al. 2010; Augusto et al. 2012b; Augusto et al. 2013; Augusto et al. 2015a) and associated with PF susceptibility (Augusto et al. 2012a; Augusto et al. 2015b). Several genes involved in regulation of immune responses have been associated with PF, including HLA (Petzl-Erler and Santamaria 1989; Pavoni et al. 2003), and more recently it has been demonstrated that a number of genes are also differentially expressed in PF patients (Malheiros et al. 2014).

Additionally, unpublished results from our group have shown that *LAIR1* mRNA levels were increased in T CD4+ cells of patients with pemphigus vulgaris (PV), a similar autoimmune disease characterized by anti-DSG3 and often also anti-DSG1 autoantibodies. In the light of these observations, we considered both *LAIR1* and *LAIR2* strong candidates for PF susceptibility. Here, we investigated if single nucleotide polymorphisms (SNP) of

these genes are associated with differential mRNA expression levels and if SNPs and differential mRNA levels of *LAIR1* and *LAIR2* influence PF susceptibility. We analysed *LAIR1* and *LAIR2* mRNA expression by quantitative PCR in PBMC of healthy controls, and compared allelic, genotypic and allele carrier frequencies of *LAIR1* and *LAIR2* polymorphisms between cases and controls. We demonstrate that variants of *LAIR1* and *LAIR2* associate with differential mRNA expression levels and interfere with PF susceptibility. We suggest that differential expression of *LAIR2* is probably the underpinning molecular mechanism that links *LAIR2* variation and PF susceptibility.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study Subjects**

Informed consent was obtained from all participants. This study was performed according Brazilian federal laws and approved by the by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Paraná.

For gene expression analyses, we collected peripheral venous blood from 177 healthy unrelated volunteers residents in Curitiba, Brazil, and surrounding areas. None of the individuals knowingly had family history of autoimmune disease. The majority of them were recruited at the blood bank of Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná, and the remaining subjects were part of the university community. Individuals were of predominantly European ancestry and 54% were women.

For the association study, a total of 233 healthy controls and 282 PF patients were analysed. Most patients were recruited at the Hospital Adventista do Pênfigo, Campo Grande, Brazil, and healthy controls were residents of the same endemic area. Patients were diagnosed based on the presence of typical lesions and diagnostic tests (histopathology and/or immunohistochemistry of skin biopsies). All individuals were unrelated and controls did not have family history of autoimmune disease. Subjects were classified according to ethnicity in Euro-Brazilian and African-Brazilian, i.e, Brazilians with predominant European (EU) and with mixed predominant African plus European ancestry (AF), respectively. Stratified analyses were performed for both groups. After careful adjustment of the proportions of EU and AF to avoid false associations, we also analysed the total sample, once this sample gives us a better representation of the whole population where PF occurs. Previous studies from our group validated this approach by showing that the distribution of alleles known to be restricted to autochthonous populations from a continent follows a gradient among the population strata, as expected if the classification

discriminated the strata according to relative contributions of the ancestral population (Probst et al. 2000; Braun-Prado et al. 2000).

### **DNA extraction and genotyping**

DNA for association studies with PF was extracted from total blood using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol (Sambrook and Russell 2001), and DNA for gene expression and genetic variation analyses was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) lysed in TRIzol Reagent (Ambion, Foster City, CA). *LAIR1* SNPs *rs3826753*, *rs7257187*, *rs74463408*, *rs3745444*, *rs56802430*, *rs11084332* and *LAIR2* SNPs *rs2042287*, *rs2287828*, *rs73070113*, *rs61737751*, *rs34429135*, *rs2277974*, *rs114834145*, *rs2277971* were genotyped by mass spectrometry-based genotyping (Sequenom, San Diego, CA). SNPs were selected based on (1) known minor allele frequency (MAF)  $\geq 0.05$  in Northern European from Utah (USA), Mexican, Colombian and Yoruba populations of the 1000 Genomes Project; (2) tag SNPs ( $r^2 \geq 0.8$ ) in at least two of the above mentioned populations. Priority was given to non-synonymous and putatively functional SNPs based on bioinformatic analyses.

### **Gene expression analyses**

Total RNA was extracted from PBMC lysed in TRIzol (Ambion, Foster City, CA), and reverse transcribed with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression levels were quantified by qPCR using TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) chemistry. TaqMan gene expression assays were used for *GUSB*, *LAIR1* (Hs00253790\_m1) and *LAIR2* (Hs00430498\_m1). The levels were normalized to the reference gene *GUSB*.

### **Statistical analyses**

Allelic, genotypic, carrier, and haplotypic frequencies were compared between groups with Fisher's two-tailed exact test. Odds ratios (OR) were estimated using GraphPad Software 6.0, La Jolla, California, USA. Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated by the chi-square test. Software PLINK (Purcell et al. 2007) was used to estimate haplotype frequencies via the E-M algorithm and to detect SNP-SNP interactions. Linkage disequilibrium (LD) was computed using Haploview 4.2 (Barrett et al. 2005). Logistic regression analyses with stepwise selection were computed by IBM SPSS Statistics 23 Software, Chicago, USA. Cycle threshold (Ct) values were calculate with Viia 7 Software v1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA), and gene expression data was obtained with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  relative quantitative method (Livak and Schmittgen 2001). Mann-Whitney two-

tailed and Kruskal-Wallis tests were used for comparison of gene expression levels in different groups using GraphPad 6.0. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### Functional annotation

In order to explore annotations for the assessed SNPs and the ones in high LD ( $D'$  and  $r^2 \geq 0.80$ ), we used the tools HaploReg3 (Ward and Kellis 2012), RegulomeDB (Boyle et al. 2012), F-SNP (Lee and Shatkay 2008), SIFT and PolyPhen predictions using Ensembl Variant Effect Predictor (McLaren et al. 2010), Genevar (Yang et al. 2010), miRNASNP (Gong et al. 2015), mirSNP (Liu et al. 2012) and PolymiRTS (Bhattacharya et al. 2014).

## RESULTS

### *SNPs mark differential LAIR1 and LAIR2 mRNA expression levels*

We sought to find out if *LAIR1* and *LAIR2* polymorphisms are associated with variable mRNA expression. Four out of six *LAIR1* SNPs analysed (*rs3826753*, *rs74463408*, *rs3745444*, and *rs56802430*) are associated with mRNA expression (Fig. 1). Among *LAIR2* SNPs, two (*rs73070113* and *rs2277971*) are associated with differential mRNA expression levels (Fig. 2).

### *LAIR1 and LAIR2 SNPs interfere with pemphigus foliaceus susceptibility*

Two out of six assessed *LAIR1* SNPs and one out of eight *LAIR2* SNPs were significantly associated with PF (Table 1). Allele G of *rs56802430* (*LAIR1*) is associated with higher susceptibility to the disease in the total sample (OR=1.52,  $p=0.0329$ ). This SNP was also associated with differential gene expression (Fig. 1). Compared to the *T/T* genotype of *rs11084332* (*LAIR1*), the *C/T* genotype is associated with a decreased risk of PF, and so are C carriers. The dominant model explains this association, since the OR of the *C/T* and *C/C* genotypes are similar and carriers of the C allele are underrepresented in both the EU and total samples (OR=0.55,  $p=0.0094$  and OR=0.57,  $p=0.0022$ , respectively). Genotype *C/T* of *rs2287828* (*LAIR2*) is significantly overrepresented among patients of the total sample (OR=1.91,  $p=0.0139$ ). The OR of *C/T* and *T/T* are similar, and T carriers have higher susceptibility to PF (OR=1.90,  $p=0.0097$ ), what evidences another case of genetic dominance.

### *SNP-SNP interactions in LAIR2*

As a means to investigate the joint effects of alleles in regards to association with PF, we performed interaction analyses with PLINK for the SNPs investigated. For *LAIR2*, the

results show statistically significant interactions for the SNPs pairs *rs2042287-rs2287828* ( $p=0.0187$ ), *rs2287828-rs114834145* ( $p=0.0138$ ) and *rs2277974-rs114834145* ( $p=0.0113$ ). Next, we performed stratified association analyses of *LAIR2* compound genotypes to further comprehend the interactions (Table 2). The dominant detrimental effect of *rs2287828 T* only manifests in the presence of *rs2042287 G/G* (OR=3.97,  $p=0.0007$ ) and *rs114834145 A/A* (OR=2.49,  $p=0.0009$ ). *rs114834145 G* shows significant detrimental effect (OR=2.18,  $p=0.0415$ ) in the presence of *rs2277974 T*. We can also observe that the protection effect of *rs2042287 A* only manifests in the presence of *rs2287828 T* (OR=0.34,  $p=0.0364$ ). It is important to note that these SNPs pairs are not in significant LD (*rs2042287* vs. *rs2287828*,  $r^2=0.08$ ; *rs2287828* vs. *rs114834145*,  $r^2=0$ ; *rs2277974* vs. *rs114834145*;  $r^2=0.07$ ) (Supplementary Fig. S1). For *LAIR1*, the interaction tests yielded no significant results (data not shown).

*A haplotype composed by interacting SNPs marks LAIR2 differential expression levels and strongly increases the risk to develop PF*

In the light of these results, we aimed to analyse haplotypes harbouring only the four interacting *LAIR2* SNPs (Table 3). Haplotype number 6 (GTCA) is strongly associated with higher susceptibility to PF (OR=4.015,  $p=0.0008$ ), and also associated with significant higher expression of *LAIR2* (GTCA vs. sum of other haplotypes, 2.10-fold,  $p=0.0069$ ) (Fig. 3a). We also verified that the compound genotype formed by these SNPs (G+/T+/C+/A+) is associated with higher susceptibility with PF (OR=2.46,  $p=0.0034$ ) and with significant higher *LAIR2* expression (Fig. 3b). We performed logistic regression analyses with stepwise selection in a model including *LAIR2* genotypes and haplotypes associated with PF in the admixed total sample. Only the presence of the higher expressed haplotype number 6 was retained in the model and explained the result (OR = 4.84; Wald = 12.027;  $p=0.001$ ).

## DISCUSSION

We investigated the association of *LAIR1* and *LAIR2* polymorphisms with differential expression levels and with PF susceptibility. *LAIR1* SNP *rs56802430* is associated with differential mRNA levels (Fig. 1). This is an intronic SNP for two *LAIR1* transcripts, and an upstream gene variant for two others. It is located next to and in LD with *rs7250548* ( $r^2=1$  in Europeans (EUR) of the 1000 Genomes database), which is bound by and changes the binding site for the transcription factor Ikaros 1 (Ikr-1), a transcription factor expressed in hematopoietic cells that functions as a regulator of lymphocyte differentiation (Pruitt et al. 2014) (Supplementary Table S1). Although *rs56802430* is apparently associated with *LAIR1*

expression (Fig. 1) and PF susceptibility (Table 1), mRNA differential expression of *LAIR1* does not seem to interfere with PF susceptibility, since we demonstrated that several other variants associated with differential expression of *LAIR1* are not associated with PF (Fig. 1; Table 1). The association found for *rs56802430* and *rs11084332* could, however, be related to their possible function (or via SNPs in high LD) other than regulation of mRNA expression.

The verification that some *LAIR1* SNPs mark gene expression, independently of expression being associated with disease or not, is important to comprehend regulatory mechanisms involved in *LAIR1* expression. In order to better understand the biological meaning of our results, we deeply explored our data using functional annotation tools (Supplementary Table S1). As an example, *rs3826753* marks *LAIR1* differential expression levels and it is a 3'UTR SNP predicted to change binding sites for microRNAs. Interestingly, *rs3826753* has an eQTL effect in *LAIR2*. Both variants *rs74463408* and *rs3745444* that associated with *LAIR1* mRNA expression, and *rs11084332*, associated with PF, are likewise in regions that seem to present several regulatory features.

From eight *LAIR2* SNPs that were investigated, only *rs2287828* is associated with PF in individual SNP analyses (Table 1). It is located in the 5'UTR region of *LAIR2* and it is also associated with susceptibility to ankylosing spondylitis (Díaz-Peña et al. 2012). Our analyses revealed statistical evidence of SNP-SNP interactions in *LAIR2*: we found *rs2287828* to interact with *rs2042287* and *rs114834145*, while *rs114834145* also interacts with *rs2277974* (Table 2). Functional annotation (Supplementary Table S1) showed that *rs2277974* is predicted to affect *LAIR2* splicing and it is in LD with *rs2277973* ( $r^2=0.93$  in EUR), that has eQTL effect in *LAIR2* in lymphoblastoid cells (Degner et al. 2012). Noteworthy, most *LAIR2* SNPs investigated or in LD with them in EUR are located within regions with repression or bivalent histone modifications (Supplementary Table S1). These results suggest a regulatory role for these SNPs, however further functional analyses are necessary to better understand the genetic basis of regulation of *LAIR1* and *LAIR2* expression.

Because *rs2287828* is associated with PF but not associated with gene expression (Table 1; Fig. 2), differential mRNA levels of *LAIR2* were apparently not associated with PF susceptibility. Nevertheless, we demonstrated that combinations of *LAIR2* SNPs were associated with differential mRNA expression levels (Fig. 3). We showed that the haplotype formed by the four interacting SNPs is strongly associated with higher susceptibility to PF (OR=4.02,  $p=0.0008$ ) (Table 3) and marks higher expression of *LAIR2* (2.01-fold,  $p=0.0069$ ) (Fig. 3a). Moreover, stepwise logistic regression analyses corroborated these results and showed that this haplotype has independent effects in PF susceptibility. Consequently, SNP-SNP interactions seem to influence *LAIR2* expression, and higher expression of *LAIR2* mRNA levels seems to influence PF susceptibility.

LAIR-2 is a secreted receptor that functions as a natural competitor for membrane-bound LAIR-1 by binding the same ligands, and thus regulating the inhibitory potential of LAIR-1 (Lebbink et al. 2008). A growing amount of evidence demonstrates the importance of these receptors in autoimmunity and inflammation. Disruption of inhibition of immune responses by LAIR-1 leads to a loss of self-tolerance, as it is evidenced that deficient LAIR-1 expression on B cells in SLE leads to dysregulation of antibody secretion (Colombo et al. 2012). Decreased expression of LAIR-1 on plasmacytoid dendritic cells of SLE patients correlates with increased IFN- $\alpha$  production, a proinflammatory mediator in SLE (Bonaccorsi et al. 2010). In RA, T CD4<sup>+</sup> cells express lower levels of membrane-bound LAIR-1, and upon TNF- $\alpha$  stimulation LAIR-1 expression decreases in Th1 and Th2 cells of healthy donors (Zhang et al. 2014). The first component of complement C1q, present in the intercellular space of PV lesions (Van Joost et al. 1972; Jordon 1980), binds LAIR-1, and this interaction inhibits immune responses such as monocyte activation (Son and Diamond 2015), IL-4 secretion, monocyte to dendritic cell (DC) differentiation and IFN- $\alpha$  production by DCs, that are reversed by LAIR-2 (Son et al. 2012). Collagen XVII, another ligand of LAIR-1 and LAIR-2, is a target of autoantibodies in blistering autoimmune diseases, such as PF, PV (Paus et al. 2006) and bullous pemphigoid. In bullous pemphigoid, these antibodies affect collagen adhesion function and thus participate in acantholysis (Franzke et al. 2005). Potentially, binding of these autoantibodies to collagen could affect LAIR-1 binding and affect immune responses in these diseases (Lebbink et al. 2006). LAIR-2 protein levels are elevated in fluid from joints and plasma of patients with RA (Lebbink et al. 2008; Olde Nordkamp et al. 2011) and in sera of patients with autoimmune thyroid diseases (Grave's and autoimmune thyroiditis) (Simone et al. 2013). In these cases LAIR-2 functions as a proinflammatory mediator by decreasing the inhibitory effects of LAIR-1 and enhancing immune responses in the lesion sites (Lebbink et al. 2008; Olde Nordkamp et al. 2011). Similarly, the expression of soluble LAIR-1 is also increased in plasma, synovial fluid and urine from RA patients, but apparently soluble LAIR-2 is a more potent antagonist of LAIR-1-collagen binding than soluble LAIR-1 (Olde Nordkamp et al. 2011; Zhang et al. 2013).

Considering the role of LAIR-2 in autoimmunity and inflammatory responses, and that *LAIR2* variable mRNA expression is directly proportional to protein levels, we propose that LAIR-2 protein higher levels are detrimental in PF by antagonizing LAIR-1 function and exacerbating immune responses. A similar scenario could be possible in a deficient LAIR-1 environment. Although we did not find association between *LAIR1* expression and PF, we cannot rule out this possibility, since mRNA expression is not necessarily equivalent to protein expression.

Our findings allow us to conclude that *LAIR1* and *LAIR2* polymorphisms are associated with variable mRNA expression levels. Additionally, the association of differential



*LAIR2* mRNA levels with an autoimmune disease gives us insights of the biological relevance of this variation of expression. It is reasonable to assume that both *LAIR1* and *LAIR2* could participate in PF pathology. The results here presented provide suggestive findings that warrant further *LAIR1* and *LAIR2* mRNA and protein expression studies in larger cohorts, not only in PF but also in other autoimmune diseases, as a way to better understand the role of these genes in immune responses.

**Ethical approval:** All stages of this study were performed in compliance with the ethical standards of the Human Research Ethics Committee of Federal University of Paraná.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Augusto DG, Hollenbach JA, Petzl-Erler ML (2015a) A deep look at KIR–HLA in Amerindians: Comprehensive meta-analysis reveals limited diversity of KIR haplotypes. *Hum Immunol* 76:272–280. doi: 10.1016/j.humimm.2015.01.025
- Augusto DG, Lobo-Alves SC, Melo MF, et al (2012a) Activating KIR and HLA Bw4 Ligands Are Associated to Decreased Susceptibility to Pemphigus Foliaceus, an Autoimmune Blistering Skin Disease. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0039991
- Augusto DG, O'Connor GM, Lobo-Alves SC, et al (2015b) Pemphigus is associated with KIR3DL2 expression levels and provides evidence that KIR3DL2 may bind HLA-A3 and A11 in vivo. *Eur J Immunol* 45:2052–2060. doi: 10.1002/eji.201445324
- Augusto DG, Piovezan BZ, Tsuneto LT, et al (2013) KIR Gene Content in Amerindians Indicates Influence of Demographic Factors. *PLoS ONE* 8:e56755. doi: 10.1371/journal.pone.0056755
- Augusto DG, Zehnder-Alves L, Pincerati MR, et al (2012b) Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. *Immunogenetics* 64:143–152. doi: 10.1007/s00251-011-0565-1
- Barenboim M, Zoltick BJ, Guo Y, Weinberger DR (2010) MicroSNiPer: a web tool for prediction of SNP effects on putative microRNA targets. *Hum Mutat* 31:1223–1232. doi: 10.1002/humu.21349
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457
- Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y (2014) PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res* 42:D86–91. doi: 10.1093/nar/gkt1028

- Bonaccorsi I, Cantoni C, Carrega P, et al (2010) The Immune Inhibitory Receptor LAIR-1 Is Highly Expressed by Plasmacytoid Dendritic Cells and Acts Complementary with NKp44 to Control IFN $\alpha$  Production. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0015080
- Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al (2012) Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res* 22:1790–1797. doi: 10.1101/gr.137323.112
- Braun-Prado K, Vieira Mion AL, Farah Pereira N, et al (2000) HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens* 56:417–427.
- Caproni M, Giomi B, Cardinali C, et al (2001) Further Support for a Role for Th2-like Cytokines in Blister Formation of Pemphigus. *Clin Immunol* 98:264–271. doi: 10.1006/clim.2000.4974
- Colombo BM, Canevali P, Magnani O, et al (2012) Defective Expression and Function of the Leukocyte Associated Ig-like Receptor 1 in B Lymphocytes from Systemic Lupus Erythematosus Patients. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0031903
- Degner JF, Pai AA, Pique-Regi R, et al (2012) DNaseI sensitivity QTLs are a major determinant of human expression variation. *Nature* 482:390–394. doi: 10.1038/nature10808
- Diaz LA, Sampaio SAP, Rivitti EA, et al (1989a) Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and Historic Epidemiologic Studies. *J Invest Dermatol* 92:4–12. doi: 10.1111/1523-1747.ep13070394
- Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, et al (1989b) Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. *J Am Acad Dermatol* 20:657–669.
- Díaz-Peña R, Aransay AM, Suárez-Álvarez B, et al (2012) A high density SNP genotyping approach within the 19q13 chromosome region identifies an association of a CNOT3 polymorphism with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 71:714–717. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200661
- Franzke C-W, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L (2005) Collagenous Transmembrane Proteins: Recent Insights into Biology and Pathology. *J Biol Chem* 280:4005–4008. doi: 10.1074/jbc.R400034200
- Gong J, Liu C, Liu W, et al (2015) An update of miRNASNP database for better SNP selection by GWAS data, miRNA expression and online tools. *Database J Biol Databases Curation*. doi: 10.1093/database/bav029
- Jansen CA, Crujisen CWA, de Ruiter T, et al (2007) Regulated expression of the inhibitory receptor LAIR-1 on human peripheral T cells during T cell activation and differentiation. *Eur J Immunol* 37:914–924. doi: 10.1002/eji.200636678
- Jobim M, Salim PH, Portela P, et al (2010) Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of Southern Brazil. *Int J Immunogenet* 37:83–89. doi: 10.1111/j.1744-313X.2009.00894.x
- Jordon RE (1980) Complement Activation in Pemphigus. *J Invest Dermatol* 74:357–358. doi: 10.1111/1523-1747.ep12543739

- Lebbink RJ, Ruiter T de, Adelmeijer J, et al (2006) Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med* 203:1419–1425. doi: 10.1084/jem.20052554
- Lebbink RJ, van den Berg MCW, de Ruiter T, et al (2008) The soluble leukocyte-associated Ig-like receptor (LAIR)-2 antagonizes the collagen/LAIR-1 inhibitory immune interaction. *J Immunol Baltim Md* 1950 180:1662–1669.
- Lee PH, Shatkay H (2008) F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. *Nucleic Acids Res* 36:D820–824. doi: 10.1093/nar/gkm904
- Lin MS, Fu CL, Aoki V, et al (2000) Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Clin Invest* 105:207–213. doi: 10.1172/JCI8075
- Liu C, Zhang F, Li T, et al (2012) MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics* 13:661. doi: 10.1186/1471-2164-13-661
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Malheiros D, Panepucci RA, Roselino AM, et al (2014) Genome-wide gene expression profiling reveals unsuspected molecular alterations in pemphigus foliaceus. *Immunology* 143:381–395. doi: 10.1111/imm.12315
- McLaren W, Pritchard B, Rios D, et al (2010) Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* 26:2069–2070. doi: 10.1093/bioinformatics/btq330
- Merlo A, Tenca C, Fais F, et al (2005) Inhibitory Receptors CD85j, LAIR-1, and CD152 Down-Regulate Immunoglobulin and Cytokine Production by Human B Lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:705–712. doi: 10.1128/CDLI.12.6.705-712.2005
- Meyaard L, Adema GJ, Chang C, et al (1997) LAIR-1, a Novel Inhibitory Receptor Expressed on Human Mononuclear Leukocytes. *Immunity* 7:283–290. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80530-0
- Meyaard L, Hurenkamp J, Clevers H, et al (1999) Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor-1 Functions as an Inhibitory Receptor on Cytotoxic T Cells. *J Immunol* 162:5800–5804.
- Olde Nordkamp MJM, van Roon JAG, Douwes M, et al (2011) Enhanced secretion of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2 (LAIR-2) and soluble LAIR-1 in rheumatoid arthritis: LAIR-2 is a more efficient antagonist of the LAIR-1-collagen inhibitory interaction than is soluble LAIR-1. *Arthritis Rheum* 63:3749–3757. doi: 10.1002/art.30612
- Paus R, Amagai M, Ahmed AR, et al (2006) Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just “witnesses of disease”? *Exp Dermatol* 15:815–815. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00499\_1.x
- Pavoni DP, Roxo VMMS, Marquart Filho A, Petzl-Erler ML (2003) Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. *Genes Immun* 4:110–116. doi: 10.1038/sj.gene.6363939

Petzl-Erler ML, Santamaria J (1989) Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? *Tissue Antigens* 33:408–414.

Poggi A, Tomasello E, Ferrero E, et al (1998) p40/LAIR-1 regulates the differentiation of peripheral blood precursors to dendritic cells induced by granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 28:2086–2091. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2086::AID-IMMU2086>3.0.CO;2-T

Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, et al (2000) HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 72:597–617.

Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, et al (2014) RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res* 42:D756–763. doi: 10.1093/nar/gkt1114

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81:559–575. doi: 10.1086/519795

Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, et al (1989) The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med* 320:1463–1469. doi: 10.1056/NEJM198906013202206

Rudnick CCC, Franceschi DSA, Marangon AV, et al (2008) Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol* 69:872–876. doi: 10.1016/j.humimm.2008.09.002

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press

Santi CG, Sotto MN (2001) Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Am Acad Dermatol* 44:446–450. doi: 10.1067/mjd.2001.112344

Sathish JG, Johnson KG, Fuller KJ, et al (2001) Constitutive association of SHP-1 with leukocyte-associated Ig-like receptor-1 in human T cells. *J Immunol Baltim Md* 166:1763–1770.

Saverino D, Fabbi M, Merlo A, et al (2002) Surface density expression of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is directly related to inhibition of human T-cell functions. *Hum Immunol* 63:534–546. doi: 10.1016/S0198-8859(02)00409-3

Simone R, Pesce G, Antola P, et al (2013) Serum LAIR-2 Is Increased in Autoimmune Thyroid Diseases. *PLoS ONE* 8:e63282. doi: 10.1371/journal.pone.0063282

Son M, Diamond B (2015) C1q-Mediated Repression of Human Monocytes Is Regulated by Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor 1 (LAIR-1). *Mol Med* 20:559–568. doi: 10.2119/molmed.2014.00185

Son M, Santiago-Schwarz F, Al-Abed Y, Diamond B (2012) C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E3160–E3167. doi: 10.1073/pnas.1212753109

Stanley JR, Klaus-Kovtun V, Sampaio SA (1986) Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris autoantibodies. *J Invest Dermatol* 87:197–201.

van der Vuurst de Vries AR, Clevers H, Logtenberg T, Meyaard L (1999) Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *Eur J Immunol* 29:3160–3167. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3160::AID-IMMU3160>3.0.CO;2-S

Van Joost T, Cormane RH, Pondman KW (1972) Direct Immunofluorescent Study of the Skin on Occurrence of Complement in Pemphigus. *Br J Dermatol* 87:466–474. doi: 10.1111/j.1365-2133.1972.tb01595.x

Wagtmann N, Rojo S, Eichler E, et al (1997) A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors. *Curr Biol CB* 7:615–618.

Ward LD, Kellis M (2012) HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res* 40:D930–D934. doi: 10.1093/nar/gkr917

Warren SJP, Arteaga LA, Rivitti EA, et al (2003) The Role of Subclass Switching in the Pathogenesis of Endemic Pemphigus Foliaceus. *J Invest Dermatol* 120:1–5. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12017.x

Yang T-P, Beazley C, Montgomery SB, et al (2010) Genevar: a database and Java application for the analysis and visualization of SNP-gene associations in eQTL studies. *Bioinformatics* 26:2474–2476. doi: 10.1093/bioinformatics/btq452

Zhang Y, Ding Y, Huang Y, et al (2013) Expression of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) on osteoclasts and its potential role in rheumatoid arthritis. *Clinics* 68:475–481. doi: 10.6061/clinics/2013(04)07

Zhang Y, Lv K, Zhang CM, et al (2014) The role of LAIR-1 (CD305) in T cells and monocytes/macrophages in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 287:46–52. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.12.005

**Table 1** - Association analyses and allelic, genotypic and allele carriers frequencies of investigated *LAIR1* and *LAIR2* SNPs

			Patients		Controls		OR <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	p <sup>d</sup>
			n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
<b><i>LAIR1</i></b> <b><i>rs56802430</i></b>	Total	AA	189	70.5	165	78.2			
	Euro	AA	131	79.9	121	86.4			
	Total	GA	69	25.7	43	20.4	1.40	0.91-2.16	0.1561
	Euro	GA	31	18.9	17	12.1	1.68	0.89-3.19	0.1167
	Total	GG	10	3.7	3	1.4	2.91	0.79-10.76	0.1543
	Euro	GG	2	1.2	2	1.4	0.92	0.13-6.66	1
	Total	A	447	83.4	373	88.4			
	Euro	A	293	89.3	259	92.5			
	Total	G	89	16.6	49	11.6	1.52	1.04-2.21	<b>0.0329</b>
	Euro	G	35	10.7	21	7.5	1.47	0.84-2.60	0.2060
Total	A+	258	96.3	208	98.6	0.37	0.10-1.37	0.1601	
Euro	A+	162	98.8	138	98.6	1.17	0.16-8.45	1	
Total	G+	79	29.5	46	21.8	1.50	0.99-2.28	0.0601	
Euro	G+	33	20.1	19	13.6	1.60	0.87-2.97	0.1688	
<b><i>LAIR1</i></b> <b><i>rs11084332</i></b>	Total	TT	153	57.1	99	43.2			
	Euro	TT	88	53.3	58	38.4			
	Total	CT	93	34.7	105	45.9	0.57	0.39-0.83	<b>0.0042</b>
	Euro	CT	62	37.6	73	48.3	0.56	0.35-0.90	<b>0.0171</b>
	Total	CC	22	8.2	25	10.9	0.57	0.30-1.07	0.0790
	Euro	CC	15	9.1	20	13.2	0.49	0.23-1.04	0.0864
	Total	T	399	74.4	303	66.2			
	Euro	T	238	72.1	189	62.6			
	Total	C	137	25.6	155	33.8	0.67	0.51-0.88	<b>0.0052</b>
	Euro	C	92	27.9	113	37.4	0.65	0.46-0.90	<b>0.0109</b>
Total	T+	246	91.8	204	89.1	1.37	0.75-2.50	0.3567	
Euro	T+	150	90.9	131	86.8	1.53	0.75-3.10	0.2830	
Total	C+	115	42.9	130	56.8	0.57	0.40-0.82	<b>0.0022</b>	
Euro	C+	77	46.7	93	61.6	0.55	0.35-0.85	<b>0.0094</b>	
<b><i>LAIR2</i></b> <b><i>rs2287828</i></b>	Total	CC	218	78.4	200	87.3			
	Euro	CC	139	81.3	132	88			
	Total	CT	54	19.4	26	11.4	1.91	1.15-3.16	<b>0.0139</b>
	Euro	CT	28	16.4	16	10.7	1.66	0.85-3.21	0.1445
	Total	TT	6	2.2	3	1.3	1.84	0.45-7.44	0.5080
	Euro	TT	4	2.3	2	1.3	1.90	0.34-10.55	0.6851
	Total	C	490	88.1	426	93			
	Euro	C	306	89.5	280	93.3			
	Total	T	66	11.9	32	7	1.79	1.15-2.79	<b>0.0101</b>
	Euro	T	36	10.5	20	6.7	1.65	0.93-2.91	0.0932
Total	C+	272	97.8	226	98.7	0.60	0.15-2.43	0.5224	
Euro	C+	167	97.7	148	98.7	0.56	0.10-3.13	0.6886	
Total	T+	60	21.6	29	12.7	1.90	1.17-3.08	<b>0.0097</b>	
Euro	T+	32	18.7	18	12	1.69	0.90-3.15	0.1227	

<sup>a</sup> n = number of alleles or individuals; <sup>b</sup> OR = odds ratio; <sup>c</sup> CI = confidence interval; <sup>d</sup> p = p-value. Bold values indicate a statistical significance at 0.05 level. All SNPs are in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group

**Table 2** - Stratified analyses for *LAI/R2* interacting SNPs

<i>rs2042287</i>	<i>rs2287828</i>	Patients		Controls		OR <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>	<i>rs2042287</i>	<i>rs2287828</i>	Patients		Controls		OR <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>
		n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%						n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
A+	T+	29	10.6	20	9.0	1.21	0.60-2.46	0.7207	A+	T+	29	10.6	20	9.0	0.34	0.12-0.92	<b>0.0364</b>
A+	C/C	49	17.9	41	18.6				G/G	T+	30	11.0	7	3.2			
G/G	T+	30	11.0	7	3.2	3.97	1.70-9.32	<b>0.0007</b>	A+	C/C	49	17.9	41	18.6	1.11	0.69-1.77	0.7204
G/G	C/C	165	60.4	153	69.2				G/G	C/C	165	60.4	153	69.2			
<b><i>rs2287828</i></b>	<b><i>rs114834145</i></b>								<b><i>rs2287828</i></b>	<b><i>rs114834145</i></b>							
T+	G+	5	1.8	7	3.1	0.29	0.08-1.00	0.0522	T+	G+	5	1.8	7	3.1	0.48	0.14-1.63	0.348
T+	A/A	55	19.9	22	9.6				C/C	G+	48	17.3	32	14.0			
C/C	G+	48	17.3	32	14.0	1.49	0.91-2.45	0.1352	T+	A/A	55	19.9	22	9.6	2.49	1.45-4.26	<b>0.0009</b>
C/C	A/A	169	61.0	168	73.4				C/C	A/A	169	61.0	168	73.4			
<b><i>rs2277974</i></b>	<b><i>rs114834145</i></b>								<b><i>rs2277974</i></b>	<b><i>rs114834145</i></b>							
T+	G+	28	10.1	12	5.3	2.18	1.09-4.45	<b>0.0415</b>	T+	G+	28	10.1	12	5.3	2.52	1.06-6.00	0.0548
T+	A/A	152	54.7	142	62.3				C/C	G+	25	9.0	27	11.8			
C/C	G+	25	9.0	27	11.8	0.60	0.31-1.15	0.1338	T+	A/A	152	54.7	142	62.3	0.69	0.45-1.06	0.1030
C/C	A/A	73	26.3	47	20.6				C/C	A/A	73	26.3	47	20.6			

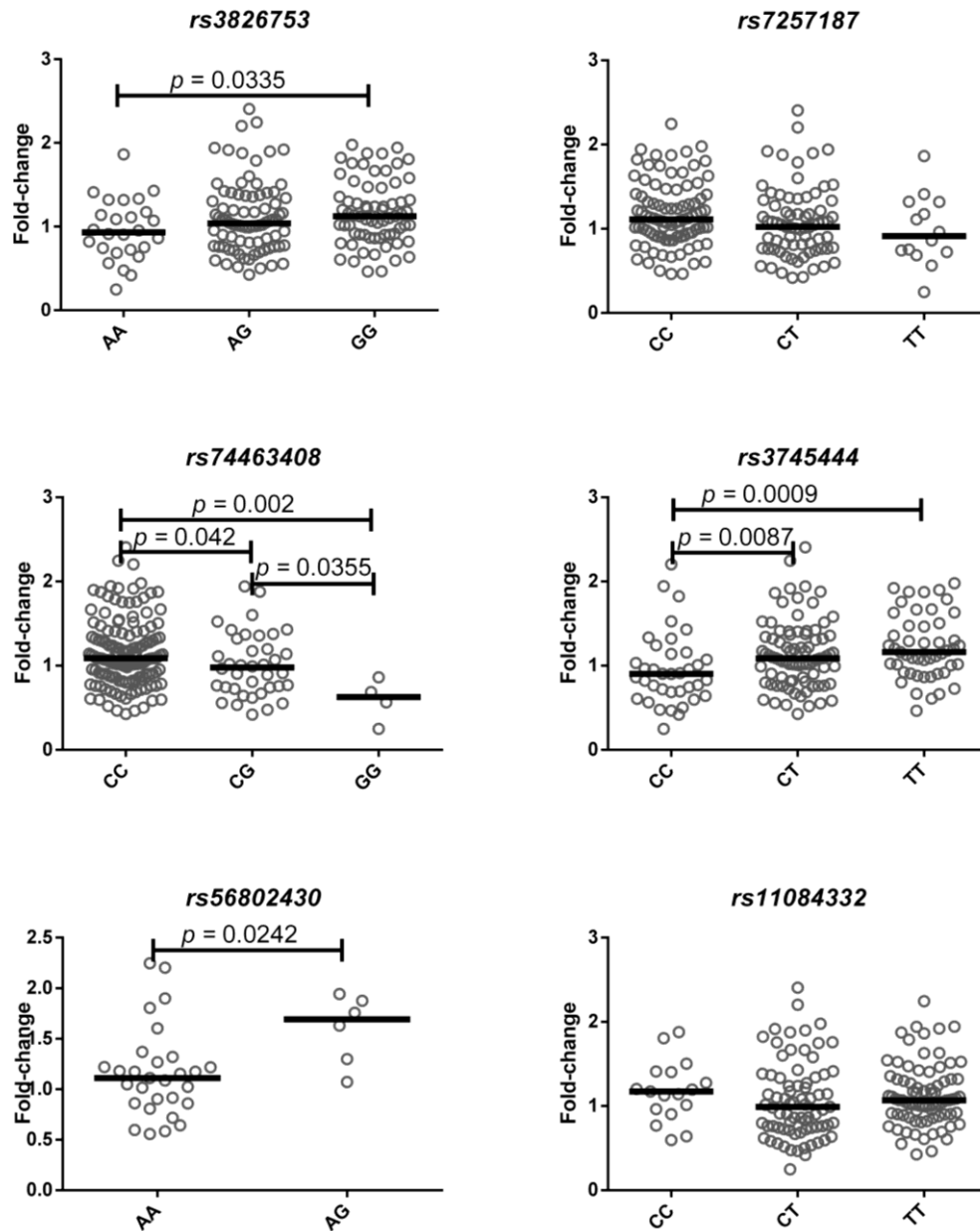
The results are for the total sample. In the left block the comparisons are stratified according to genotypes of the SNPs shown in the first column, and in the right block, by the SNPs in the second column. In the *rs2042287* and *rs2287828* analyses, for example, the numbers of carriers *rs2042287* A+, *rs2287828* T+ and *rs2042287* A+, *rs2287828* CC are compared between patients and controls. In the comparison to the right, individuals *rs2042287* A+, *rs2287828* T+ are compared to *rs2042287* GG, *rs2287828* T+. Therefore, in the left block the effect of *rs2287828* is being investigate in the absence of the effect of *rs2042287*, and the opposite occurs in the right block. <sup>a</sup>n = number of alleles or individuals; <sup>b</sup>OR = odds ratio; <sup>c</sup>CI = confidence interval; <sup>d</sup>*p* = *p*-value. Bold values indicate a statistical significance at 0.05 level

**Table 3** - Frequencies of haplotypes harbouring *LAIR2* interacting SNPs (*rs2042287-rs2287828-rs2277974-rs114834145*) compared between patient and control samples

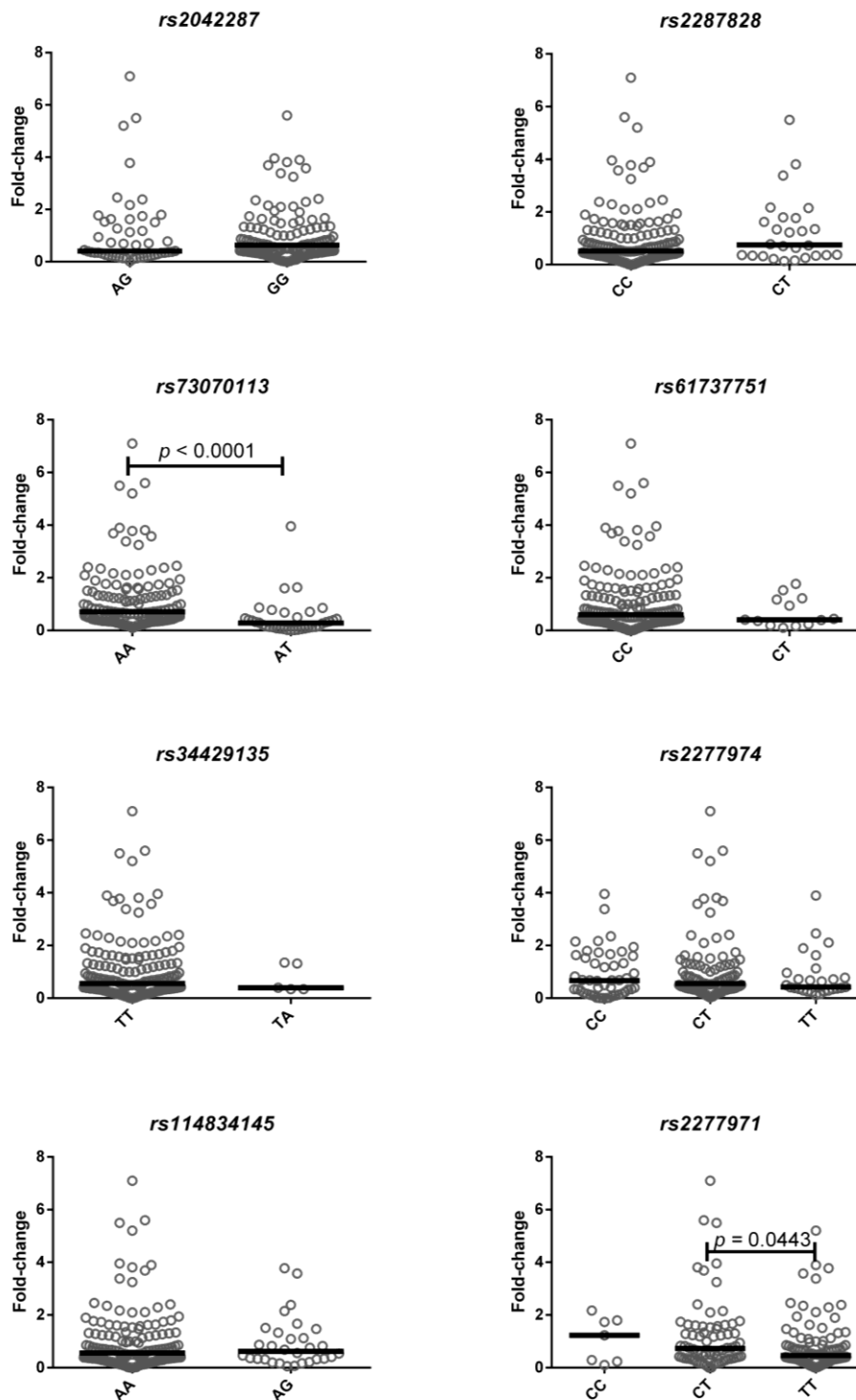
		Patients		Controls		OR <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>
		n <sup>a</sup>	%	n <sup>a</sup>	%			
1	GCCG	53	9.5	38	8.2	1.17	0.76-1.81	0.5092
2	ATTA	27	4.8	20	4.3	1.12	0.62-2.03	0.7651
3	GTTA	10	1.8	3	0.6	2.79	0.76-10.2	0.1596
4	ACTA	15	2.7	19	4.1	0.64	0.32-1.28	0.2235
5	GCTA	173	31	162	35.1	0.83	0.64-1.08	0.1803
6	GTCA	28	5.0	6	1.3	4.02	1.65-9.79	<b>0.0008</b>
7	ACCA	47	8.4	31	6.7	1.28	0.80-2.05	0.3443
8	GCCA	204	36.6	179	38.7	0.91	0.71-1.18	0.4758

The list of haplotypes does not include all possible haplotypes, since some are considered by the software as too infrequent to be considered in the analyses. The association analyses were performed using the sum of all other haplotypes as reference. <sup>a</sup> n = number of alleles or individuals; <sup>b</sup> OR = odds ratio; <sup>c</sup> CI = confidence interval; <sup>d</sup> *p* = p-value. Bold values indicate a statistical significance at 0.05 level



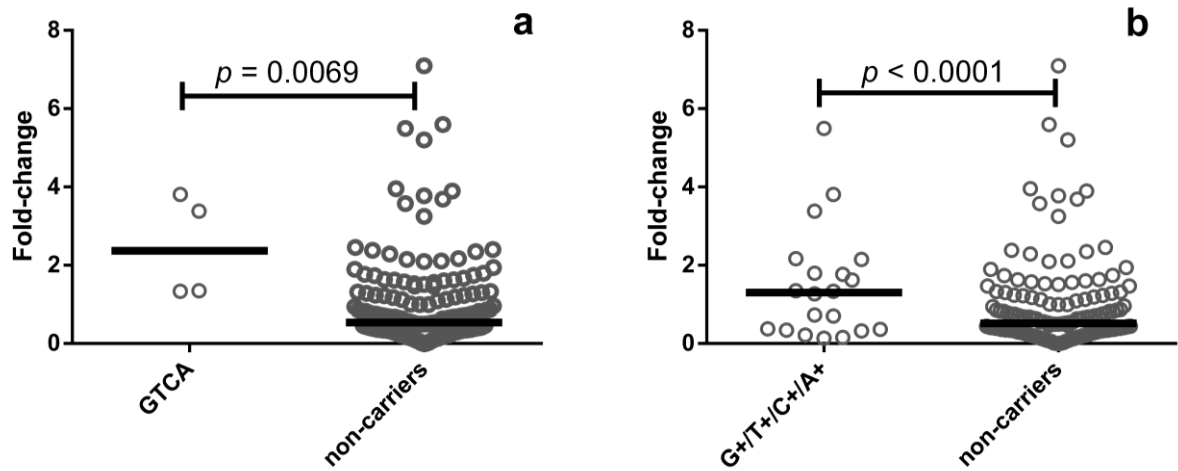
**Fig. 1**

Relative *LAIR1* mRNA levels in healthy controls PBMC. Populations with less than 4 individuals were not displayed. Fold-change values were calculated through the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. The horizontal bars at the scatter plots indicate the median.  $P$  values indicate a statistical significance at 0.05 level, and were calculated by Mann-Whitney's test. Scatter plots were constructed from the raw non-normalised, fold-change data, using GraphPad Software 6.0, La Jolla, California, USA



**Fig. 2**

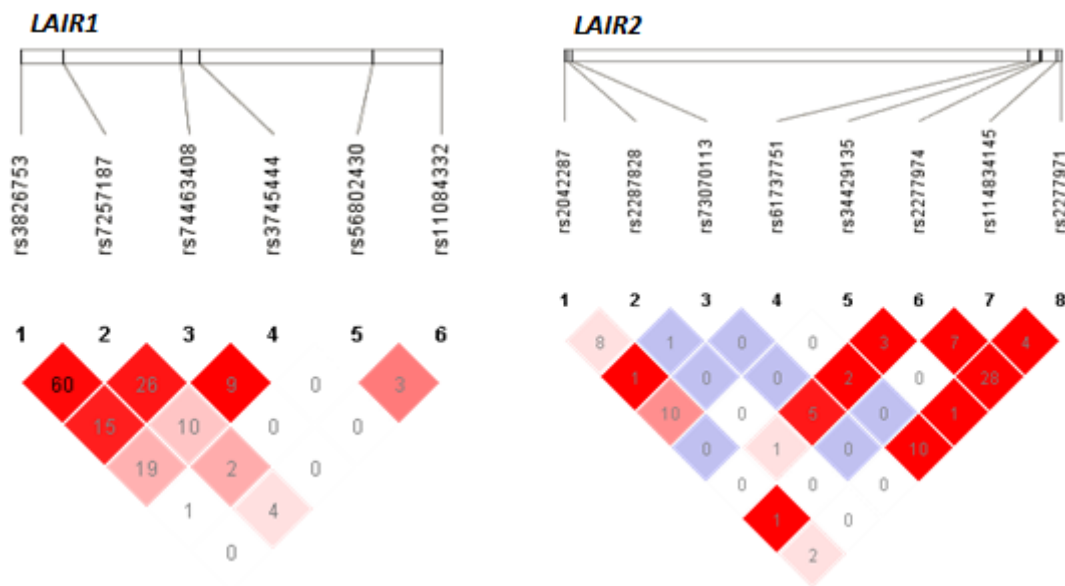
Relative *LAIR2* mRNA levels in healthy controls PBMC. Populations with less than 4 individuals were not displayed. Fold-change values were calculated through the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. The horizontal bars at the scatter plots are indicate the median. *P* values indicate a statistical significance at 0.05 level, and were calculated by Mann-Whitney's test. Scatter plots were constructed from the raw non-normalised, fold-change data, using GraphPad Software 6.0, La Jolla, California, USA



**Fig. 3**

Relative *LAIR2* mRNA levels in PBMC of healthy controls carriers of haplotypes and compound genotypes formed by the interacting SNPs *rs2042287*, *rs2287828*, *rs2277974* and *rs114834145*. **a** Relative *LAIR2* mRNA levels in carriers and non-carriers of the haplotype *GTCA* (*rs2042287*-*rs2287828*-*rs2277974*-*rs114834145*). **b** Relative *LAIR2* mRNA levels in carriers and non-carriers of the compound genotype *rs2042287* G, *rs2287828* T, *rs2277974* C, *rs114834145* A. Fold-change values were calculated through the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. The horizontal bars at the scatter plots indicate the median. *P* values indicate a statistical significance at 0.05 level, and were calculated by Mann-Whitney's test. Scatter plots were constructed from the raw non-normalised, fold-change data, using GraphPad Software 6.0, La Jolla, California, USA

## Electronic supplementary material 1



**Fig. S1**

Linkage disequilibrium among SNP pairs distributed over the genes *LAIR1* and *LAIR2*. LD plots for *LAIR1* (left) and *LAIR2* (right) SNPs for the admixed total sample. The colors are indicative of  $D'$ /logarithm of odds (LOD), and values correspond to  $r^2$ . Bright red color represents LOD score for  $LD \geq 2$  and  $D' = 1$ , shades of pink/red represents  $LOD \geq 2$  and  $D' < 1$ , blue color represents  $D' = 1$  but  $LOD < 2$ , and white squares represent  $LOD < 2$  and  $D' < 1$ . In this study, we defined high LD as  $D'$  and  $r^2 \geq 0.80$ . LD plots were constructed using genotype data from the admixed total sample, using Haploview 4.2 (Barrett et al. 2005)

## Electronic supplementary material 2

### Table S1 (EM FORMATO ELETRÔNICO)

Predicted regulatory effects of *LAIR1* and *LAIR2* SNPs that are associated with differential gene expression and/or associated with pemphigus foliaceus. In this table we show the SNPs investigated in the study and SNPs in LD ( $D'$  and  $r^2 > 0.80$ ) in EUR (European), CEU (Northern European from Utah, USA), CLM (Colombian) and MXL (Mexican) populations of the 1000 Genomes project, their genomic positions and their predicted effects on DNA regulatory elements. Data was obtained using the HaploReg3 database (Ward and Kellis 2012), RegulomeDB (Boyle et al. 2012), F-SNP (Lee and Shatkay 2008), SIFT and PolyPhen predictions using Ensembl Variant Effect Predictor (McLaren et al. 2010), Genevar (Yang et al. 2010), miRNASNP (Gong et al. 2015), miRSNP (Liu et al. 2012), PolymiRTS (Bhattacharya et al. 2014) and microSNIPER (Barenboim et al. 2010). For the eQTL analyses with Genevar, we considered significant results with  $p < 0.001$ . miRNA binding predictions tools were only consulted for SNPs in the 3'UTR region

## **CD33 POLYMORPHISMS ARE ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION AND VARIABLE SUSCEPTIBILITY TO PEMPHIGUS FOLIACEUS**

### **Authors and Affiliations**

Carolina Maciel Camargo<sup>1</sup>, Danillo Gardenal Augusto<sup>1</sup>, Maria Luiza Petzl-Erler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Human Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

### **Corresponding author**

Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler  
Departamento de Genética  
Universidade Federal do Paraná  
Caixa Postal 19071  
81531-990  
Curitiba, Brazil  
Tel: (+5541) 3361-1746  
perler@ufpr.br

**Acknowledgments:** We thank the patients and healthy controls for volunteering for this study, and the staff of the Hospital Adventista do Pênfigo and of the Banco de Sangue do Hospital de Clínicas from the Federal University of Paraná for their support. This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação Araucária and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank CNPq CAPES for the research fellowships granted for all authors, in especial the Science without Borders Program for the Young Talent Fellowship awarded for the second author.

## ABSTRACT

CD33 is an inhibitory receptor member of the sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) family. In this study, we investigated if *CD33* single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with differential mRNA expression levels, and if SNPs and altered mRNA expression levels of *CD33* influence susceptibility to pemphigus foliaceus (PF), an autoimmune blistering skin disease endemic in Brazil. For that, we analyzed 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CD33* by mass spectrometry-based genotyping (Sequenom, San Diego, CA) in 282 patients and 233 healthy controls. We report association of three polymorphisms with variable susceptibility to PF in a population of European predominant ancestry (*rs273640* T+, OR=0.48,  $p=0.0025$ ; *rs2455069* G+, OR=0.53,  $p=0.0063$ ; *rs1803254* C+, OR=1.9,  $p=0.0076$ ), and association of a fourth SNP with PF in an admixed population (*rs3865444* G+, OR=0.52,  $p=0.0151$ ). On stratified analyses, we observed interactions between three other SNPs (*rs3826566*, *rs34912427* and *rs35112940*) in Euro-descendants. In addition, we measured expression of two mRNA *CD33* variants and overall mRNA levels of *CD33* in 177 healthy subjects by quantitative gene expression analyses. We demonstrate that detrimental genotypes and haplotypes mark higher *CD33m* expression levels, a mRNA variant that codes for a supposedly non-functional protein. Our data suggests that genetic variants that regulate *CD33* expression influence PF susceptibility, and provides important evidence regarding the role of *CD33* in immune responses.

**Keywords:** *CD33*, pemphigus foliaceus, autoimmunity, genetic susceptibility.

## INTRODUCTION

CD33, also known as Siglec-3, is a member of the sialic acid-binding immunoglobulin (Ig) Ig-like lectins (Siglec) receptor family. It is expressed in myeloid progenitor cells, monocytes and dendritic cells, and in subsets of lymphoid cells (Andrews et al. 1983; Nakamura et al. 1994; Hernandez-Caselles et al. 2005). CD33 (Entrez gene ID 945) is encoded by a gene located at 19q13.4 (Peiper et al. 1988), and it originates three transcripts validated by RefSeq. Alternative splicing of the exon 2 originates two isoforms of CD33: a full-length CD33M and a truncated CD33m (Hernandez-Caselles et al. 2005). The full-length CD33M contains an extracellular Ig-like V-set sialic-acid binding domain, an extracellular Ig-like C2-set domain and two immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM) in their cytoplasmatic domain (Crocker and Varki 2001), while CD33m lacks the extracellular sialic

acid binding domain (Hernandez-Caselles et al. 2005). CD33 has two tyrosine residues in its cytoplasmic domain that when phosphorylated function as docking sites for the phosphatases SHP-1 and/or SHP-2 enabling CD33 to function as an inhibitory receptor (Paul et al. 2000). CD33m is thought to be non-functional since it does not have a sialic acid binding domain, but the functional consequences of the exon 2 splicing have not yet been characterized (Perez-Oliva et al. 2011; Malik et al. 2013; Raj et al. 2014). CD33 is highly expressed in acute myeloid leukemia cells (Matutes et al. 1985), and its aberrant expression is also related to Alzheimer, in which CD33M higher levels in microglia cells of patients (Griciuc et al. 2013; Bradshaw et al. 2013) and CD33 mRNA overall levels are detrimental (Karch *et al.*, 2012). CD33 has not yet been directly associated with susceptibility to autoimmune diseases, differently from other members of the Siglec family (Crocker et al. 2007; Macauley et al. 2014).

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune blistering skin disease characterized by the presence of autoantibodies IgG4 (Rock et al. 1989) specific to desmoglein (DSG) 1 (Stanley *et al.* 1986), one of the major components of desmosomes. The blistering process occurs by the detachment of the upper layers of the epidermis by a process called acantholysis. PF occurs as an endemic form in Brazil (known as "fogo selvagem" or wild fire), exhibiting high incidence in some endemic areas (Friedman et al. 1995; Hans-Filho et al. 1996), that is thought to be triggered by exposure to one or more unknown environmental factors (Diaz *et al.* 1989). PF patients present abnormalities in several immune cell populations (Santi and Sotto 2001; Warren *et al.* 2003; and unpublished results from our group), but a hallmark of the disease is the presence of DSG-1 specific T lymphocytes, and a predominant Th2 cytokine pattern in the cytokine inflammatory infiltrate of lesions (Lin et al. 2000).

It has been demonstrated that altered function or expression of inhibitory receptors in immune cells leads to dysregulated immune responses that can lead to autoimmune disease and aggravate inflammatory responses (Watanabe and Nakajima 2012; Macauley et al. 2014). CD33 has been shown to be upregulated in T CD4+ cells of patients with PF (Malheiros et al. 2014), and it is a target of autoantibodies in pemphigus vulgaris (PV) (a more common and aggressive form of pemphigus) patients (Kalantari-Dehaghi et al. 2011). In the light of these observations, we considered CD33 as a strong candidate gene for susceptibility to PF and possibly other autoimmune diseases. In this study, we analyzed CD33 mRNA expression in PBMC of healthy controls, and compared allelic, genotypic and allele carrier frequencies of ten polymorphisms between cases and controls. We demonstrate that CD33 variants are associated with PF and with variable mRNA expression levels, and our data suggests that CD33 expression interferes with PF susceptibility.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Subjects

For the association study, 233 healthy subjects and 282 PF patients were analyzed. Most patients were recruited at the Hospital Adventista do Pênfigo, Campo Grande, Brazil; and healthy controls were residents of the same endemic area. Patients were diagnosed based on the presence of typical lesions and diagnostic tests (histopathology and/or immunohistochemistry of skin biopsies). All individuals were unrelated. Most individuals do not have family history of autoimmune disease. Subjects were classified according to ethnicity in Euro-Brazilian and African-Brazilian, i.e, Brazilians with predominant European (EU) and with mixed predominant African plus European ancestry (AF), respectively. Stratified analyses were performed for both groups. After careful adjustment of the proportions of EU and AF to avoid false associations, we also analyzed the admixed total sample, once this sample might give us a better representation of the whole population where PF occurs.

For gene expression analyses, we collected peripheral venous blood from additional 177 healthy unrelated volunteers residents of Curitiba, Brazil, and surrounding areas. None of the individuals had family history of autoimmune disease. Approximately 70% of individuals were blood donors, and were recruited at the blood bank of Hospital de Clínicas of Curitiba, and the remaining subjects were part of the university community. Individuals were of predominantly European ancestry and 54% were women.

Informed consent was obtained from all participants. All stages of this study were performed according Brazilian federal laws, and in compliance with protocols approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Paraná.

### DNA extraction and genotyping

DNA for association studies with PF was extracted from total blood using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol (Sambrook and Russell 2001), and DNA for gene expression analyses was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) lysed in TRIzol Reagent (Ambion, Foster City, CA). 10 SNPs (*rs273640*, *rs3826656*, *rs3865444*, *rs2455069*, *rs11882250*, *rs7256496*, *rs34912427*, *rs58981829*, *rs35112940* and *rs1803254*) were genotyped by mass spectrometry-based genotyping (Sequenom, San Diego, CA). SNPs were selected based on (1) known minor allele frequency (MAF)  $\geq 0.05$  in Northern European from Utah (USA), Mexican, Colombian and Yoruba populations of the 1000 Genomes Project; (2) tag SNPs ( $r^2 \geq 0.8$ ) in at least two of the above mentioned populations. Priority was given to non-synonymous and functional SNPs based on bioinformatic analyses.



### Gene expression analyses

Total RNA was extracted from PBMC lysed in TRIzol (Ambion, Foster City, CA), and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression levels were quantified by qPCR using TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) chemistry. TaqMan gene expression assays were used for *GUSB* and *CD33* overall expression (*CD33M+CD33m*) (Hs00233544\_m1). Custom TaqMan assays were designed for the *CD33m* (forward primer 5'-CCGCTGCTGCTACTGCTG-3', reverse primer 5'-CTAGAGTGCCAGGGATGAGGA-3', probe 5'-TGTGGGCAGACTTGA-3') and *Var3* (forward primer 5'-AGGAATGACACCCACCCTACC-3', reverse primer 5'-CATCATCTCCTGATCTGTTGGC-3', probe 5'-CCTCCCCGGTACGTTG-3') transcripts. The efficiency of the customized assays was 103.12% for the *CD33m* assay, and 102.82% for the *Var3* assay. Levels were normalized to the reference gene *GUSB*.

### Statistical analyses

Allelic, genotypic, carrier, and haplotypic frequencies were compared between groups with Fisher's two-tailed exact test. Odds ratios (OR) were estimated using GraphPad Software 6.0, La Jolla, California, USA. Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated by the chi-square test. Software PLINK (Purcell et al. 2007) was used to estimate haplotype frequencies via the E-M algorithm and to detect SNP-SNP interactions. Linkage disequilibrium was computed using Haploview 4.2 (Barrett et al. 2005). Logistic regression analyzes with stepwise selection were computed by IBM SPSS Statistics 23 Software, Chicago, USA. Cycle threshold (Ct) values were calculate with Viia 7 Software v1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA), and gene expression data was obtained with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  relative quantitative method (Livak and Schmittgen 2001). Amplification efficiencies of custom assays were validated by determining the slope of Ct versus dilution from a dilution series using Viia 7 Software 1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Mann-Whitney two-tailed and Kruskal-Wallis tests were used for comparison of gene expression levels in different groups using GraphPad 6.0. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### Functional annotation

In order to explore annotations for the assessed SNPs and the ones in high LD ( $D'$  and  $r^2 \geq 0.80$ ), we used the tools HaploReg3 (Ward and Kellis 2012), RegulomeDB (Boyle et al. 2012), rSNP Base (Guo et al. 2014), F-SNP (Lee and Shatkay 2008), SIFT and PolyPhen predictions using Ensembl Variant Effect Predictor (McLaren et al. 2010), miRNASNP (Gong et al. 2015), mirSNP (Liu et al. 2012) and PolymiRTS (Bhattacharya et al. 2014).

## RESULTS

### *CD33 SNPs interfere with pemphigus foliaceus susceptibility*

Four polymorphisms are significantly associated with variable susceptibility to PF (Table 1). Compared to the *G/G* genotype of *rs273640*, the *G/T* genotype is associated with a decreased risk of PF in the EU stratum, and so are *T* allele carriers. Apparently, the dominant model explains the associations, since the OR of the *T/T* and *G/T* genotypes are similar and carriers of the *T* allele are underrepresented in both the EU and total samples (OR=0.48,  $p=0.0025$  and OR=0.67,  $p=0.0337$ , respectively). Linkage disequilibrium (LD) between *rs273640* and *rs2455069* is high ( $r^2=0.89$ ) (Supplementary Fig. S1), and therefore the information for both SNPs is redundant.

Individuals with the *rs3865444 G/G* and *G/T* genotype are less susceptible to PF in comparison with *T/T* individuals in the total sample (*G/G* vs. *T/T*, OR=0.53,  $p=0.0288$ ; *G/T* vs. *T/T*, OR=0.51,  $p=0.0194$ ). Accordingly, there are less carriers of the *G* allele in the patients than in the control group (OR=0.52,  $p=0.0151$ ), what evidences another case of recessively of higher susceptibility to PF.

Likewise, significant differences between patients and controls were found regarding frequencies of *rs1803254*. The frequency of genotype *C/C* is increased in patients of the EU stratum and total sample (OR=3.09,  $p=0.0263$  and OR=2.69,  $p=0.0043$ , respectively). Allelic interaction is less evident than the other three SNPs, because the OR of heterozygotes differs significantly from that of the reference genotype *G/G* only in the EU sample.

Single marker association analyses for *rs3826656*, *rs11882250*, *rs7256496*, *rs34912427*, *rs58981829* and *rs35112940*, did not show statistically significant differences between the patient and control samples.

### *SNP-SNP interactions in CD33*

We performed analysis of interaction between all *CD33* SNPs assessed in this study, and found statistically significant interactions for the SNPs pairs *rs3826566-rs34912427* ( $p=0.0435$ ) and *rs3826566-rs35112940* ( $p=0.0082$ ). Next, we performed stratified analyses for these two pairs and found significant results in the EU stratum (Table 2). *rs34912427 T* and *rs35112940 A* detrimental effects only manifest in the presence of *rs3826566 G* (OR=2.75,  $p=0.0101$  and OR=3.64,  $p=0.0386$ ), and *rs3826656 G* only manifests with *rs35112940 A* (OR=4.40,  $p=0.0164$ ). It is important to note that these SNP pairs are not in significant LD (Supplementary Fig. S1) ( $r^2=0.14$  between *rs3826566* and *rs34912427*; and  $r^2=0.03$  between *rs3826566* and *rs35112940*). We also found that, out of the haplotypes harboring these three SNPs, *ATG* (*rs3826656-rs34912427-rs35112940*) is associated with higher susceptibility to PF (Supplementary Table 1). Diplotype analyses showed that *ADel*

(*rs3826656-rs34912427*) is associated with lower susceptibility to PF in comparison with *GDeI* and *AT* (data not shown). Moreover, these haplotypes mark other causal variant (s), since both *A* and *DeI* appear in haplotypes of higher and lower susceptibility.

Logistic regression analyses including the genotypes and haplotypes associated with PF were performed in order to select the most important variants associated with PF susceptibility. We observed no significant signal of association after regressing out the effect of the genotype *rs273640 T+* in the EU stratum.

#### *SNPs mark differential mRNA expression levels*

We sought to find out if *CD33* polymorphisms are associated with variable mRNA expression. Homozygotes for *rs3826656 A*, *rs34912427 T* and *rs35112940 A* and carriers of *rs3865444 T* express significantly lower levels of *CD33M+CD33m* (Supplementary Fig. S2). Carriers of *rs273640 G*, *rs3865444 T*, *rs2455069 A*, *rs3412427 T*, *rs35112940 A* and *rs1803254 C* present significantly higher expression of *CD33m* compared to homozygotes (Fig. 1). Only *rs3826656* accounts for differences in expression of *Var3* (Supplementary Fig. S3).

#### *Haplotypes associated with higher susceptibility to PF mark higher levels of CD33m*

In order to investigate the joint effects of *CD33* variants in the regulation of gene expression and susceptibility with PF, we analyzed multi-marker haplotypes harboring SNPs associated with differential expression of *CD33*. From the haplotypes harboring only SNPs associated with variable levels of *CD33m*, haplotype number 1 (*GTATGC*), is significantly overrepresented among patients (Table 3, A), and associated with the highest levels of *CD33m* (Figure 2, a and b). Likewise, healthy carriers of haplotype 6 (*TGGDeI/GG*) present significant lower levels of *CD33m* mRNA (Figure 2, a and c), and the haplotype is associated with protection to PF. Analyses of haplotypes formed by the SNPs associated with variable *CD33M+CD33m* expression demonstrated that haplotype 2 (*ATTG*) is overrepresented among patients (Table 3, B), and it is associated with higher levels of *CD33m* (Figure 3, a and b), but not *CD33M+CD33m* (data not shown).

#### *Functional annotation of CD33 SNPs*

Functional annotation of the SNPs (Supplementary Table 2) indicates that a number of the significantly associated SNPs and the ones with high LD are located in regulatory regions. *rs1803254*, a 3' untranslated region (3'UTR) SNP of *CD33* is predicted to affect binding of microRNAs. According to two microRNA target prediction tools, allele *G* disrupts binding for miR-582-5p and creates binding for miR-374c-3p. Altered regulation by microRNA may be the cause of this association and deserves further investigation.

Alternatively, *rs1803254* could be in LD with another functional SNP, such as *rs989502* ( $r^2=0.98$  in EUR), which is a candidate for being an expression quantitative trait locus (eQTL) for *CD33* in the liver (Schadt et al. 2008). *rs2455069* is a missense SNP (Arg69Gly) located in the exon 2, in high LD ( $r^2=0.89$  in EUR) with the upstream SNP *rs273640*. *rs2455069* is an eQTL for *CD33* in monocytes (Zeller et al. 2010) and supposedly affects *CD33* splicing and binding of transcription factors, such as NF-kappaB. Several SNPs are in high LD with *rs2455069* and *rs273640*, and could also be the actual functional SNP. *rs1697553* ( $r^2=1$  in EUR), for example, has been found to be an eQTL for *CD33* in monocytes (Zeller et al. 2010), and *rs2459141* presents strong regulatory features. *rs3826656*, located upstream of *CD33*, is the only SNP in our study that is associated with *Var3* expression and not with *CD33m*. This SNP is in high LD with *rs273635* ( $r^2=0.99$  in EUR), also located at 5' of *CD33*. Both SNPs are eQTL for *CD33* in monocytes (Zeller et al. 2010). SNP *rs35112940*, a missense SNP (Arg302Gly) located in the sixth exon of *CD33*, is predicted to alter splicing by modifying an exonic splicing enhancer/silencer. The role of *rs3865444* has been validated with functional studies. It has been proposed that allele *T* of *rs3865444*, located in the upstream region of *CD33*, acts through its proxy *rs12459419 T*, a missense (Ala14Val) variant residing in exon 2 that alters *CD33* splicing (Malik et al. 2013; Raj et al. 2014). *rs34912427* probably acts through the same proxy SNP *rs12459419*, since it is LD with it ( $r^2=0.99$  in EUR).

## DISCUSSION

In this study, we hypothesized that *CD33* polymorphisms can directly or indirectly regulate expression of *CD33* and affect susceptibility to PF. We showed significant associations of four polymorphisms with PF. *rs2455069 G* and *rs273640 T* are significantly associated with lower susceptibility, while *rs1803254 C* is associated with higher susceptibility to PF in a European predominant ancestry sample (EU). In the admixed sample, carriers of *rs3865444 G* and *rs1803254 G* show lower susceptibility to develop PF, and although not significant, the association results goes in the same direction in the EU sample. In Alzheimer's disease (AD), *rs3865444* major allele *G* is detrimental (Hollingworth et al. 2011; Naj et al. 2011; Deng et al. 2012; Tan et al. 2013), as well as in acute myeloid leukemia (AML), where homozygotes for the minor allele *T* of *rs12459419*, a proxy SNP of *rs3865444* ( $r^2=1$  in the population of that study and in Europeans (EUR) of the 1000 Genomes database), are underrepresented among patients (Mortland et al. 2013). *rs34912427* is an intronic SNP in LD with *rs3865444* ( $r^2=0.81$  in the admixed sample), but it is not associated with PF probably for the lack of total LD. Despite not showing association

effects with PF in the single-marker analyses, we demonstrated that SNPs *rs3826656*, *rs34912427* and *rs35112940* are interacting, and the detrimental effects of alleles *G*, *T* and *A*, respectively, jointly alters susceptibility to PF. *rs3826656 G* is also detrimental in AD (Bertram et al. 2008; Yuan et al. 2012). In AML, *rs35112940 G* is associated with lower relapse risk and superior disease-free survival of patients.

We also measured overall levels of *CD33* mRNA (comprising *CD33M* and *CD33m*) and levels of mRNA variants *CD33m* and *Var3* in PBMC of healthy individuals, and investigated if variable expression is related to *CD33* genotypes. We found association of seven polymorphisms with variable expression of *CD33*. Carriers of *rs1803254 C*, *rs3865444 T*, *rs34912427 T*, *rs35112940 A*, *rs2455069 A* and *rs273640 G* have higher *CD33m* levels. *CD33m* increased expression is accompanied by lower levels of *CD33M+CD33m*, although only for *rs3865444 T*, *rs34912427 T* and *rs35112940 A* the differential expression of *CD33M+CD33m* is statistically significant. Carriers of *rs3826656 A* show lower *Var3* levels, and in homozygosis the allele is associated with lower overall *CD33* expression.

In apparent agreement with our results, Mortland *et al.* (2013) reported that patients with AML carriers of *rs1803254 C* express lower levels of CD33 on leukemic blasts ( $p=0.029$ ). Also in accord with our results, *rs3865444 G* is associated with higher *CD33* mRNA overall levels (Malik et al. 2013) (although this result was not replicated by Griciuc *et al.*, 2013), higher levels of the exon 2 (Raj et al. 2014), decreased levels of *CD33m* mRNA (Malik et al. 2013) and higher expression of CD33 on the surface of monocytes and microglia cells (Griciuc et al. 2013; Bradshaw et al. 2013; Raj et al. 2014). Interestingly, the *rs3865444* genotype had no effect in terms of the expression of the truncated protein CD33m, indicating the greater expression of CD33 on cell surface is due to the greater expression of CD33M (Raj et al. 2014). In acute myeloid leukemia, homozygosis of *T* allele of *rs12459419*, a proxy SNP of *3465444*, is associated with lower CD33 protein levels (Mortland et al. 2013), which is in consonance with the above mentioned studies in AD. We also showed that homozygosis of *rs2455069 G* and *rs273640 T* is associated with significant lower expression of *CD33m*, and although not significant, higher levels of *CD33M+CD33m*. Mortland *et al.* (2013), however, showed that *rs2455069 A/A* is associated with higher expression of CD33 on acute myeloid leukemia blasts (Mortland et al. 2013), but the another study did not confirm the results (Lamba et al. 2008). Mortland *et al.* (2013) also showed that *rs35112940 G* is associated with higher expression of CD33 on leukemic blasts of AML (although the result was not statistically significant), which apparently is in accord with our study. It is important to note, however, that most of the above mentioned studies measured CD33 protein levels, and therefore the results might not be directly comparable to our results

of mRNA levels. These results show that *CD33* polymorphisms mark different mRNA levels of *CD33*, and variable expression of *CD33* is associated with AML and AD pathogenesis.

Interestingly, we found that variants associated with higher PF susceptibility are also associated with higher *CD33m* expression, and vice-versa. *CD33m* levels are inversely related to *CD33* overall levels (*CD33M+CD33m*, as we call in this study), despite most cases being not statistically significant for *CD33M+CD33m*. Thus, differential *CD33* expression might represent the molecular underpinning for the association between *CD33* polymorphisms and susceptibility to PF.

The verification that some *CD33* SNPs mark gene expression, independently of expression being associated with disease or not, is important to comprehend regulatory mechanisms involved in gene expression. In order to better understand the biological meaning of our results, we deeply explored our data using functional annotation tools (Supplementary Table S2, summarized in Results). Besides *in silico* analyses, functional validation is required to establish a conclusion about the causal interaction between these polymorphisms and *CD33* expression, since genetic variation can alter phenotypes in a number of ways, at the level of RNA and protein (Johnson *et al.* 2005; Lee and Shatkay 2008; Sadee *et al.* 2011). Nonetheless, even without these results, we can suppose that the SNPs we found to be associated with variable *CD33* expression appear to influence splicing or transcript turnover, as the SNPs displayed different patterns of association depending on the *CD33* transcript.

Most of our association results are stronger in the EU stratum. In the case of *rs3865444*, the association did not replicate in the EU population probably due to lack of statistical power. One explanation could be that the functional polymorphisms could be in different haplotypes in each population, and the possibility is supported by differences in allele frequencies observed between European and African subjects. In a second scenario, *CD33* could be interacting with other genetic and environmental factors that differ in the African and European population. In this case, an allele could promote changes in *CD33* expression in both populations, but have contradictory phenotypic effects. Higher expression of *CD33m* could have a protective effect in the AF population, for example.

Logistic regression analysis indicated that *rs273640 T+* is the independent variant that influences PF susceptibility in the EU stratum. In comparison with other variables included in the regression model, this genotype is not the most strongly variable associated with *CD33m* levels. It is possible that *rs273640 T+* directly or via a SNP in high LD marks the differential expression of *CD33* at the protein level and/or disturbs post-translational modification sites, and *CD33* altered function and/or altered protein levels could be the main risk factor for PF.

A genome-wide expression study performed in our group (Malheiros et al. 2014) demonstrated that T CD4<sup>+</sup> lymphocytes of patients with generalized PF express approximately 3-fold more *CD33M* in comparison with healthy controls and with patients with localized PF. A genome-wide expression analysis in PV showed that *CD33* is 1.94-fold more expressed in PBMC of patients with active PV in comparison with patients in remission of the disease (Dey-Rao et al. 2013). Furthermore, CD33 is a target of autoantibodies in PV, and when data was sorted by ratio of positive patient to control frequencies of antigen recognition, it was found that anti-CD33 was one of the most specific PV antibody, since CD33 was recognized by PV antibodies 27.7 times more than controls (Kalantari-Dehaghi et al. 2011; Kalantari-Dehaghi et al. 2013).

CD33 has constitutive repressor activity on monocytes due to interactions with sialic acids residues in *cis* or *trans* (Lajaunias et al. 2005; Hernandez-Caselles et al. 2005). The disruption of CD33 binding to its ligand and *CD33* gene silencing results in monocyte activation and enhanced secretion of the proinflammatory mediators IL-1- $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$ . The activation of monocytes by T cell contact or by Fc $\gamma$ R engagement of tissue bound autoantibodies, for example, is accompanied by a decrease in CD33 surface expression and increased release of several pro-inflammatory mediators. Therefore, CD33 down-regulation follows monocyte activation, and since the repressor activity of CD33 is lowered, it amplifies the events following activation (Lajaunias et al. 2005).

The inflammatory infiltrate in pemphigus presents several cell types, including polymorphonuclear cells, monocytes, B and T cells (Nestor et al. 1987; Grando et al. 1989; D'Auria et al. 1997; Santi and Sotto 2001). Monocytes participate in the initiation and propagation of autoimmune diseases by its function in phagocytosis and production of proinflammatory mediators (Ahmad 2007; Nicholson et al. 2009; Katsiari et al. 2010; Son and Diamond 2015), and a number of evidence shows that cytokines produced by monocytes play an important role in pemphigus acantholysis and inflammatory response (Larsen et al. 1989; Kasahara et al. 1991; Burge et al. 1992; Bechtel et al. 1996; D'Auria et al. 1997; Feliciani et al. 1999; Feliciani et al. 2000; O'Toole et al. 2000; López-Robles et al. 2001; Bhol et al. 2001; Baroni et al. 2002; Rocha-Rodrigues et al. 2003; Chiapa-Labastida et al. 2011).

Raj et al. (2014) showed that difference in monocyte cell surface CD33 expression related to *rs3865444* genotype is due primarily to increased expression of the CD33M isoform, while the protein expression of CD33m is not associated with the genotype. We described association of *rs3865444* with differential expression of *CD33m* at the mRNA level, as well as Malik et al. (2013). This could be an example of the non direct correlation between mRNA expression and protein expression. *CD33m*, in this scenario, could be an unstable mRNA variant that codes for an unstable protein, for example. We also showed that

higher susceptibility to PF seems to be associated with higher expression of *CD33m* mRNA, and the expression of *CD33m* appears to be inversely related to the overall expression of *CD33*. Thus it is plausible to assume that the differential expression of *CD33m* that we detected is inversely related to expression of membrane-bound CD33M. Lower expression of CD33M in monocytes could be detrimental in the pathogenesis of PF, since it leads to lower inhibition of monocytes, and thus higher secretion of pro-inflammatory cytokines.

We cannot rule out the possibility that *CD33m* mRNA levels are directly related to protein levels. Because CD33m lacks the V-set Ig domain that mediates sialic acid binding, this molecule is probably not functional (Malik et al. 2013). Thus, cells expressing higher levels of CD33m could have lower activation thresholds. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that this molecule is functional, since the intracellular domains are intact.

Up to date there are no reports about a direct relation between CD33 and autoimmunity, except for studies suggesting a relation between myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (Gabrilovich and Nagaraj 2009) with autoimmune diseases. Our findings allow us to conclude that *CD33* polymorphisms are related to differential expression of *CD33* and to variable susceptibility to PF, and that *CD33m* mRNA levels may be the underpinning molecular mechanism behind the associations between *CD33* SNPs and PF pathology. It is reasonable to think that CD33 participates in the exacerbated immune response in PF, and not in the etiology of the disease. Nevertheless, the results here presented provide suggestive findings that warrant further mRNA and protein expression studies in larger cohorts of PF patients.

**Ethical approval:** All stages of this study were performed in compliance with the ethical standards of the Human Research Ethics Committee of Federal University of Paraná.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

Ahmad S (2007) Autoimmunity: Monocytes take centre stage. *Nat Rev Immunol* 7:659–659. doi: 10.1038/nri2166

Andrews RG, Torok-Storb B, Bernstein ID (1983) Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies. *Blood* 62:124–132.

Baroni A, Perfetto B, Ruocco E, et al (2002) Cytokine pattern in blister fluid and sera of patients with pemphigus. *Dermatol Basel Switz* 205:116–121. doi: 63895



- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457
- Bechtel MJ, Reinartz J, Rox JM, et al (1996) Upregulation of Cell-Surface-Associated Plasminogen Activation in Cultured Keratinocytes by Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Exp Cell Res* 223:395–404. doi: 10.1006/excr.1996.0094
- Bertram L, Lange C, Mullin K, et al (2008) Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am J Hum Genet* 83:623–632. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.10.008
- Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y (2014) PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res* 42:D86–91. doi: 10.1093/nar/gkt1028
- Bhol KC, Desai A, Kumari S, et al (2001) Pemphigus Vulgaris: The Role of IL-1 and IL-1 Receptor Antagonist in Pathogenesis and Effects of Intravenous Immunoglobulin on Their Production. *Clin Immunol* 100:172–180. doi: 10.1006/clim.2001.5061
- Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al (2012) Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res* 22:1790–1797. doi: 10.1101/gr.137323.112
- Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, et al (2013) CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci* 16:848–850. doi: 10.1038/nn.3435
- Burge SM, Marshall JM, Cederholm-Williams SA (1992) Plasminogen binding sites in normal human skin. *Br J Dermatol* 126:35–41.
- Caproni M, Giomi B, Cardinali C, et al (2001) Further Support for a Role for Th2-like Cytokines in Blister Formation of Pemphigus. *Clin Immunol* 98:264–271. doi: 10.1006/clim.2000.4974
- Chiapa-Labastida M, Zentella-Dehesa A, León-Dorantes G, Becker I (2011) Pemphigus vulgaris: accumulation of apoptotic cells in dermis and epidermis possibly relates to pathophysiology through TNF-alpha production by phagocytes. *Eur J Dermatol EJD* 21:874–888. doi: 10.1684/ejd.2011.1508
- Crocker PR, Paulson JC, Varki A (2007) Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7:255–266. doi: 10.1038/nri2056
- Crocker PR, Varki A (2001) Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol* 22:337–342.
- D'Auria L, Bonifati C, Mussi A, et al (1997) Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. *Eur Cytokine Netw* 8:383–387.
- Deng Y-L, Liu L-H, Wang Y, et al (2012) The prevalence of CD33 and MS4A6A variant in Chinese Han population with Alzheimer's disease. *Hum Genet* 131:1245–1249. doi: 10.1007/s00439-012-1154-6
- Dey-Rao R, Seiffert-Sinha K, Sinha AA (2013) Genome-wide expression analysis suggests unique disease-promoting and disease-preventing signatures in Pemphigus vulgaris. *Genes Immun* 14:487–499. doi: 10.1038/gene.2013.44

- Diaz LA, Sampaio SAP, Rivitti EA, et al (1989a) Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and Historic Epidemiologic Studies. *J Invest Dermatol* 92:4–12. doi: 10.1111/1523-1747.ep13070394
- Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, et al (1989b) Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. *J Am Acad Dermatol* 20:657–669.
- Feliciani C, Toto P, Amerio P, et al (2000) In Vitro and In Vivo Expression of Interleukin-1 $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  mRNA in Pemphigus Vulgaris: Interleukin-1 $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  are Involved in Acantholysis. *J Invest Dermatol* 114:71–77. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00835.x
- Feliciani C, Toto P, Amerio P (1999) In vitro C3 mRNA expression in Pemphigus vulgaris: complement activation is increased by IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ . *J Cutan Med Surg* 3:140–144.
- Friedman H, Campbell I, Rocha-Alvarez R, et al (1995) Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in native Americans from Brazil. *J Am Acad Dermatol* 32:949–956.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162–174. doi: 10.1038/nri2506
- Gong J, Liu C, Liu W, et al (2015) An update of miRNASNP database for better SNP selection by GWAS data, miRNA expression and online tools. *Database J Biol Databases Curation*. doi: 10.1093/database/bav029
- Grando SA, Glukhenky BT, Drannik GN, et al (1989) MEdiators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 125:925–930. doi: 10.1001/archderm.1989.01670190059006
- Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, et al (2013) Alzheimer's Disease Risk Gene CD33 Inhibits Microglial Uptake of Amyloid Beta. *Neuron* 78:631–643. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.014
- Guo L, Du Y, Chang S, et al (2014) rSNPBase: a database for curated regulatory SNPs. *Nucleic Acids Res* 42:D1033–D1039. doi: 10.1093/nar/gkt1167
- Hans-Filho G, Santos V dos, Katayama JH, et al (1996) An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *J Invest Dermatol* 107:68–75. doi: 10.1111/1523-1747.ep12298213
- Hernandez-Caselles T, Martinez-Esparza M, Perez-Oliva AB, et al (2005) A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol* 79:46–58. doi: 10.1189/jlb.0205096
- Hollingworth P, Harold D, Sims R, et al (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:429–435. doi: 10.1038/ng.803
- Johnson AD, Wang D, Sadee W (2005) Polymorphisms affecting gene regulation and mRNA processing: Broad implications for pharmacogenetics. *Pharmacol Ther* 106:19–38. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.11.001

Kalantari-Dehaghi M, Anhalt GJ, Camilleri MJ, et al (2013) Pemphigus Vulgaris Autoantibody Profiling by Proteomic Technique. *PLoS ONE* 8:e57587. doi: 10.1371/journal.pone.0057587

Kalantari-Dehaghi M, Molina DM, Farhadieh M, et al (2011) New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology. *Exp Dermatol* 20:154–156. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01193.x

Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, et al (1991) IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* 74:60–67.

Katsiari CG, Liossis S-NC, Sfikakis PP (2010) The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal. *Semin Arthritis Rheum* 39:491–503. doi: 10.1016/j.semarthrit.2008.11.002

Lajaunias F, Dayer J-M, Chizzolini C (2005) Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *Eur J Immunol* 35:243–251.

Lamba JK, Pounds S, Cao X, et al (2008) Coding polymorphisms in CD33 and response to gemtuzumab ozogamicin in pediatric patients with AML: a pilot study. *Leukemia* 23:402–404. doi: 10.1038/leu.2008.185

Larsen CG, Zachariae COC, Oppenheim JJ, Matsushima K (1989) Production of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by human dermal fibroblasts in response to interleukin 1 or tumor necrosis factor. *Biochem Biophys Res Commun* 160:1403–1408. doi: 10.1016/S0006-291X(89)80160-3

Lee PH, Shatkay H (2008) F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. *Nucleic Acids Res* 36:D820–824. doi: 10.1093/nar/gkm904

Lin MS, Fu CL, Aoki V, et al (2000) Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Clin Invest* 105:207–213. doi: 10.1172/JCI8075

Liu C, Zhang F, Li T, et al (2012) MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics* 13:661. doi: 10.1186/1471-2164-13-661

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods San Diego Calif* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

López-Robles E, Avalos-Díaz E, Vega-Memije E, et al (2001) TNF $\alpha$  and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. *Int J Dermatol* 40:185–188. doi: 10.1046/j.1365-4362.2001.01083.x

Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC (2014) Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* 14:653–666. doi: 10.1038/nri3737

Malheiros D, Panepucci RA, Roselino AM, et al (2014) Genome-wide gene expression profiling reveals unsuspected molecular alterations in pemphigus foliaceus. *Immunology* 143:381–395. doi: 10.1111/imm.12315

Malik M, Simpson JF, Parikh I, et al (2013) CD33 Alzheimer's Risk-Altering Polymorphism, CD33 Expression, and Exon 2 Splicing. *J Neurosci* 33:13320–13325. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1224-13.2013

Matutes E, Rodriguez B, Polli N, et al (1985) Characterization of myeloid leukemias with monoclonal antibodies 3C5 and MY9. *Hematol Oncol* 3:179–186.

McLaren W, Pritchard B, Rios D, et al (2010) Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* 26:2069–2070. doi: 10.1093/bioinformatics/btq330

Mortland L, Alonzo TA, Walter RB, et al (2013) Clinical Significance of CD33 Nonsynonymous Single-Nucleotide Polymorphisms in Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia Treated with Gemtuzumab-Ozogamicin-Containing Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 19:1620–1627. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3115

Naj AC, Jun G, Beecham GW, et al (2011) Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:436–441. doi: 10.1038/ng.801

Nakamura Y, Noma M, Kidokoro M, et al (1994) Expression of CD33 antigen on normal human activated T lymphocytes [letter]. *Blood* 83:1442–1443.

Nestor MS, Cochran AJ, Ahmed AR (1987) Mononuclear cell infiltrates in bullous disease. *J Invest Dermatol* 88:172–175.

Nicholson LB, Raveney BJE, Munder M (2009) Monocyte dependent regulation of autoimmune inflammation. *Curr Mol Med* 9:23–29.

O'Toole EA, Mak LL, Guitart J, et al (2000) Induction of keratinocyte IL-8 expression and secretion by IgG autoantibodies as a novel mechanism of epidermal neutrophil recruitment in a pemphigus variant. *Clin Exp Immunol* 119:217–224.

Paul SP, Taylor LS, Stansbury EK, McVicar DW (2000) Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* 96:483–490.

Peiper SC, Ashmun RA, Look AT (1988) Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human gene encoding the CD33 myeloid differentiation antigen. *Blood* 72:314–321.

Perez-Oliva AB, Martinez-Esparza M, Vicente-Fernandez JJ, et al (2011) Epitope mapping, expression and post-translational modifications of two isoforms of CD33 (CD33M and CD33m) on lymphoid and myeloid human cells. *Glycobiology* 21:757–770. doi: 10.1093/glycob/cwq220

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81:559–575. doi: 10.1086/519795

Raj T, Ryan KJ, Replogle JM, et al (2014) CD33: increased inclusion of exon 2 implicates the Ig V-set domain in Alzheimer's disease susceptibility. *Hum Mol Genet* 23:2729–2736. doi: 10.1093/hmg/ddt666

- Rocha-Rodrigues DB, Paschoini G, Pereira SAL, et al (2003) High Levels of Interleukin-1 in Patients with Endemic Pemphigus Foliaceus. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:741–743. doi: 10.1128/CDLI.10.5.741-743.2003
- Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, et al (1989) The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med* 320:1463–1469. doi: 10.1056/NEJM198906013202206
- Sadee W, Wang D, Papp A, et al (2011) Pharmacogenomics of the RNA World: Structural RNA Polymorphisms in Drug Therapy. *Clin Pharmacol Ther* 89:355–365. doi: 10.1038/clpt.2010.314
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press
- Santi CG, Sotto MN (2001) Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Am Acad Dermatol* 44:446–450. doi: 10.1067/mjd.2001.112344
- Schadt EE, Molony C, Chudin E, et al (2008) Mapping the genetic architecture of gene expression in human liver. *PLoS Biol* 6:e107. doi: 10.1371/journal.pbio.0060107
- Son M, Diamond B (2015) C1q-Mediated Repression of Human Monocytes Is Regulated by Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor 1 (LAIR-1). *Mol Med* 20:559–568. doi: 10.2119/molmed.2014.00185
- Stanley JR, Klaus-Kovtun V, Sampaio SA (1986) Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris autoantibodies. *J Invest Dermatol* 87:197–201.
- Tan L, Yu J-T, Zhang W, et al (2013) Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 9:546–553. doi: 10.1016/j.jalz.2012.08.007
- Ward LD, Kellis M (2012) HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res* 40:D930–D934. doi: 10.1093/nar/gkr917
- Warren SJP, Arteaga LA, Rivitti EA, et al (2003) The Role of Subclass Switching in the Pathogenesis of Endemic Pemphigus Foliaceus. *J Invest Dermatol* 120:1–5. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12017.x
- Watanabe N, Nakajima H (2012) Coinhibitory Molecules in Autoimmune Diseases. *J Immunol Res* 2012:e269756. doi: 10.1155/2012/269756
- Yuan Q, Chu C, Jia J (2012) Association studies of 19 candidate SNPs with sporadic Alzheimer's disease in the North Chinese Han population. *Neurol Sci* 33:1021–1028. doi: 10.1007/s10072-011-0881-0
- Zeller T, Wild P, Szymczak S, et al (2010) Genetics and beyond--the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. *PLoS One* 5:e10693. doi: 10.1371/journal.pone.0010693
- Zhou T, Wang T (2014) A Novel Approach to Investigate Functional Exonic SNPs Associated with Lung Diseases at Post-Transcriptional Stage. *Int J Respir Pulm Med* 1:002e.

**Table 1** - Allelic, and genotypic and allele carrier frequencies of the associated SNP in *CD33*, and association with risk of PF

	Genotype	Patients		Controls		OR	95% CI	p	
		n	%	n	%				
<b>rs273640</b>	Total	GG	121	44.5	77	34.8			
	EU	GG	80	47.9	44	30.6			
	Total	GT	114	41.9	113	51.1	0.64	0.44-0.95	<b>0.025</b>
	EU	GT	66	39.5	78	54.2	0.47	0.28-0.77	<b>0.0031</b>
	Total	TT	37	13.6	31	14.0	0.76	0.434-1.33	0.3907
	EU	TT	21	12.6	22	15.3	0.53	0.26-1.06	0.0741
	Total	G +	235	86.4	190	86.0	1.04	0.62-1.73	0.8963
	EU	G +	146	87.4	122	84.7	1.25	0.66-2.39	0.5137
	Total	T +	151	55.5	144	65.2	0.67	0.47-0.96	<b>0.0337</b>
	EU	T +	87	52.1	100	69.4	0.48	0.30-0.76	<b>0.0025</b>
<b>rs2455069</b>	Total	AA	125	45.1	84	36.4			
	EU	AA	81	47.7	49	32.5			
	Total	AG	122	44.0	120	52.0	0.68	0.47-0.99	<b>0.0471</b>
	EU	AG	72	42.4	82	54.3	0.53	0.33-0.85	<b>0.012</b>
	Total	GG	30	10.8	27	11.7	0.75	0.41-1.35	0.3647
	EU	GG	17	10.0	20	13.3	0.51	0.25-1.08	0.0895
	Total	A +	247	89.2	204	88.3	1.09	0.63-1.89	0.7792
	EU	A +	153	90.0	131	86.8	1.37	0.69-2.73	0.3859
	Total	G +	152	54.9	147	63.6	0.69	0.49-0.99	<b>0.047</b>
	EU	G +	89	52.4	102	67.6	0.53	0.33-0.83	<b>0.0063</b>
<b>rs1803254</b>	Total	GG	155	55.4	143	61.9			
	EU	GG	100	57.8	109	72.2			
	Total	CG	90	32.1	76	32.9	1.09	0.75-1.60	0.6982
	EU	CG	56	32.4	36	23.8	1.7	1.03-2.79	<b>0.0451</b>
	Total	CC	35	12.5	12	5.2	2.69	1.34-5.39	<b>0.0043</b>
	EU	CC	17	9.8	6	4.0	3.09	1.17-8.14	<b>0.0263</b>
	Total	G +	245	87.5	219	94.8	0.38	0.19-0.76	<b>0.0052</b>
	EU	G +	156	90.2	145	96.0	0.38	0.15-0.99	0.0506
	Total	C +	125	44.6	88	38.1	1.31	0.92-1.87	0.1495
	EU	C +	73	42.2	42	27.8	1.9	1.19-3.02	<b>0.0076</b>
<b>rs3865444</b>	Total	GG	120	43.2	107	46.3			
	EU	GG	67	39.2	71	46.7			
	AF	GG	55	50.5	37	48.1			
	Total	GT	109	39.2	101	43.7	0.96	0.66-1.40	0.8486
	EU	GT	74	43.3	64	42.1	1.23	0.76-1.97	0.4701
	AF	GT	41	37.6	37	48.1	0.75	0.41-1.37	0.3564
	Total	TT	49	17.6	23	10.0	1.9	1.09-3.33	<b>0.0288</b>
	EU	TT	30	17.5	17	11.2	1.87	0.95-3.70	0.0906
	AF	TT	13	11.9	3	3.9	2.92	0.78-10.95	0.1596
	Total	G +	229	82.4	208	90.0	0.52	0.30-0.88	<b>0.0151</b>
EU	G +	141	82.5	135	88.8	0.59	0.31-1.12	0.1159	
AF	G +	96	88.1	74	96.1	0.3	0.08-1.09	0.0652	
Total	T +	158	56.8	124	53.7	1.14	0.80-1.61	0.5308	
EU	T +	104	60.8	81	53.3	1.36	0.87-2.12	0.1784	
AF	T +	54	49.5	40	51.9	0.91	0.51-1.63	0.7677	

OR = odds ratio; CI = confidence interval; n= number of alleles or individuals; P=p-value. Bold values indicate a statistical significance at 0.05 level. All SNPs are in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group

**Table 2** - Stratified analysis for interaction between CD33 SNPs in the EU stratum

<i>rs3826656</i>	<i>rs34912427</i>	Patients		Controls		OR	95% CI	<i>p</i>
		n	%	n	%			
G+	T+	35	21.2	17	11.5	2.75	1.30-5.80	<b>0.0101</b>
G+	Del/Del	30	18.2	40	27.0			
A/A	T+	76	46.1	67	45.3	1.13	0.59-2.18	0.7404
A/A	Del/Del	24	14.5	24	16.2			
G+	T+	35	21.2	17	11.5	1.82	0.93-3.53	0.1017
A/A	T+	76	46.1	67	45.3			
G+	Del/Del	30	18.2	40	27.0	0.75	0.36-1.57	0.4587
A/A	Del/Del	24	14.5	24	16.2			
<b><i>rs3826656</i></b>	<b><i>rs35112940</i></b>							
G+	A+	14	8.4	4	2.7	3.64	1.12-11.79	<b>0.0386</b>
G+	G/G	51	30.7	53	36.1			
A/A	A+	31	18.7	39	26.5	0.58	0.32-1.05	0.0737
A/A	G/G	70	42.2	51	34.7			
G+	A+	14	8.4	4	2.7	4.40	1.32-14.73	<b>0.0164</b>
A/A	A+	31	18.7	39	26.5			
G+	G/G	51	30.7	53	36.1	0.70	0.41-1.19	0.2275
A/A	G/G	70	42.2	51	34.7			

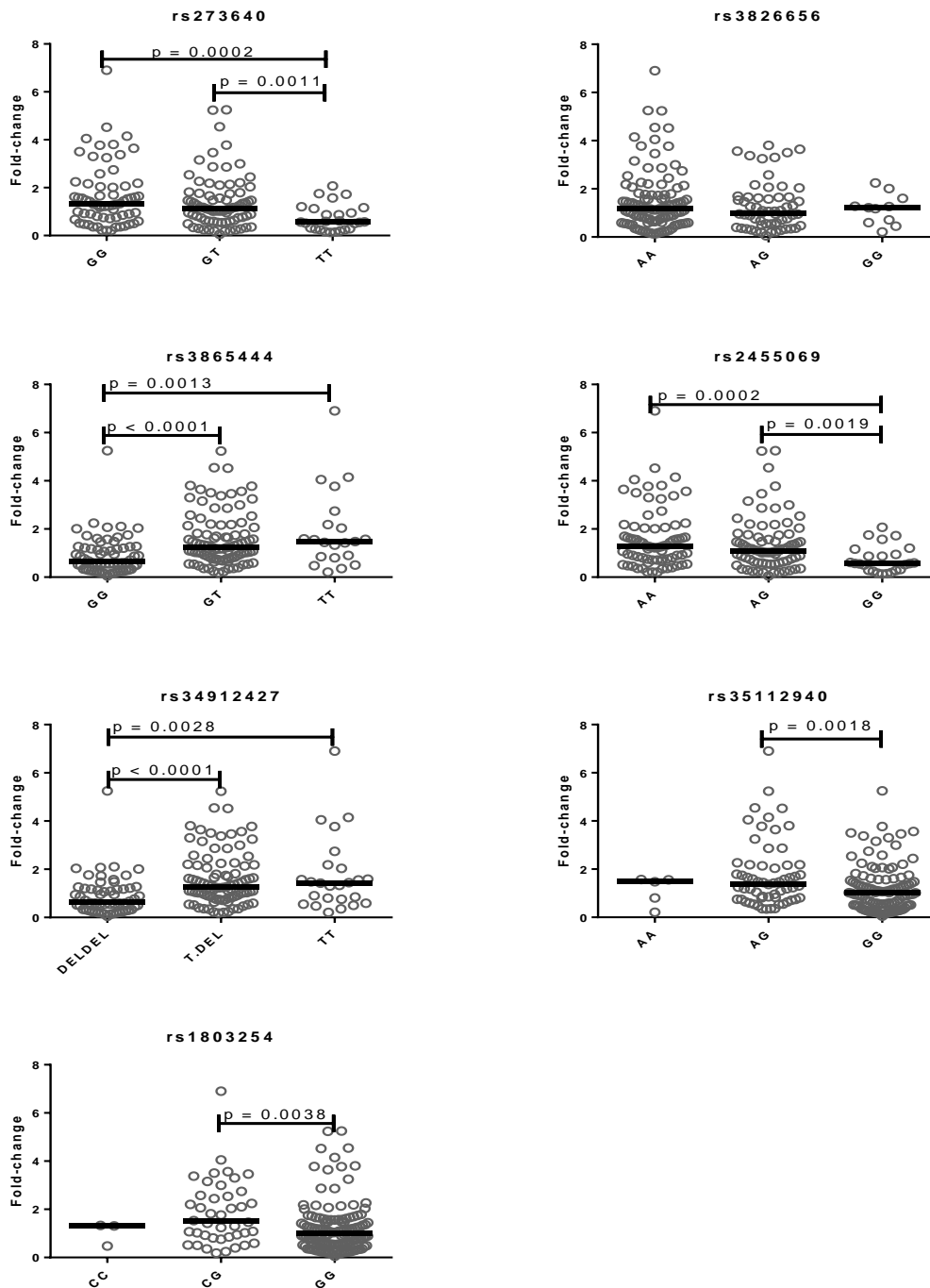
OR = odds ratio; CI = confidence interval; n=number of individuals; *P*=p-value. Bold values indicate a statistical significance at 0.05 level. The first two comparisons of every SNP pair are stratified according to the first allele, and the last two comparisons are stratified to the second allele. In the first comparison of compound genotypes formed by *rs3826656* and *rs34912427*, for example, the numbers of carriers *rs3826656* G+, *rs34912427* T+ and *rs3826656* G+, *rs34912427* Del/Del are compared between patients and controls. Therefore, the effect of *rs34912427* is being investigated in the absence of the effect of *rs3826656*

**Table 3** - Frequencies of haplotypes harboring *CD33* SNPs associated with variable expression of *CD33* mRNA variants compared between patient and control samples

a	Patients		Controls		OR	95% IC	P	b	Patients		Controls		OR	95% CI	p		
	n	%	n	%					n	%							
1	<i>GTATGC</i>	72	21.1	35	11.5	2.05	1.32-3.18	<b>0.0014</b>	1	<i>ATTA</i>	46	13.5	50	16.4	0.79	0.51-1.22	0.3190
2	<i>GGADelGC</i>	12	3.51	9	2.96	1.19	0.50-2.87	0.8251	2	<i>ATTG</i>	86	25.1	47	15.5	1.84	1.24-2.73	<b>0.0025</b>
3	<i>GTATAG</i>	43	12.6	51	16.8	0.71	0.46-1.11	0.1464	3	<i>AGTG</i>	8	2.34	11	3.62	0.64	0.25-1.61	0.3603
4	<i>TGGTGG</i>	4	1.17	8	2.63	0.44	0.13-1.47	0.2434	4	<i>GGDelG</i>	74	21.6	69	22.7	0.94	0.65-1.36	0.7762
5	<i>GTATGG</i>	15	4.39	10	3.29	1.35	0.60-3.05	0.5429	5	<i>AGDelG</i>	122	35.7	126	41.4	0.78	0.57-1.08	0.1448
6	<i>TGGDelGG</i>	97	28.4	110	36.2	0.70	0.50-0.97	<b>0.0350</b>									
7	<i>TGADelGG</i>	4	1.17	2	0.66	1.79	0.32-9.83	0.6893									
8	<i>GGADelGG</i>	80	23.4	72	23.7	0.98	0.68-1.42	1.0000									

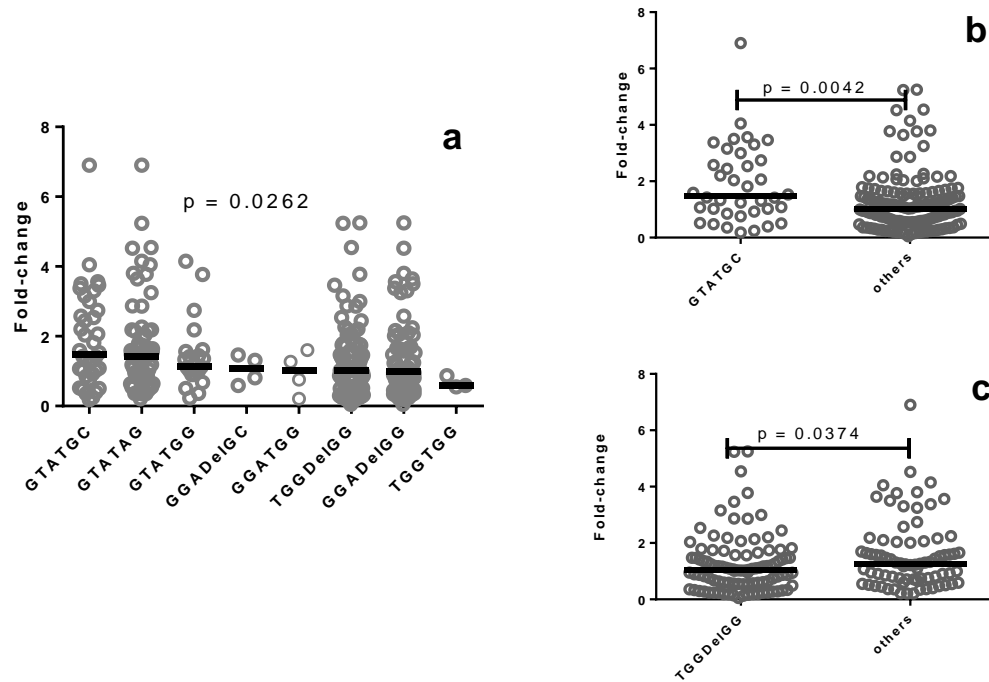
**a** Haplotypes harboring SNPs associated with variable *CD33M+CD33m* (*rs3826656-rs3865444-rs34912427-rs35112940*). **b** Haplotypes harboring SNPs associated with variable *CD33m* (*rs273640-rs3865444-rs2455069-rs34912427-rs35112940-rs1803254*). Analyses were performed for the EU stratum. OR = odds ratio; CI = confidence interval; n=number of haplotypes; p = p- value. Bold values indicate a statistical significance at 0.05 level. The list of haplotypes does not include all possible haplotypes, since some are too infrequent for meaningful statistical analysis. The association analyses were performed using the sum of all other haplotypes as reference





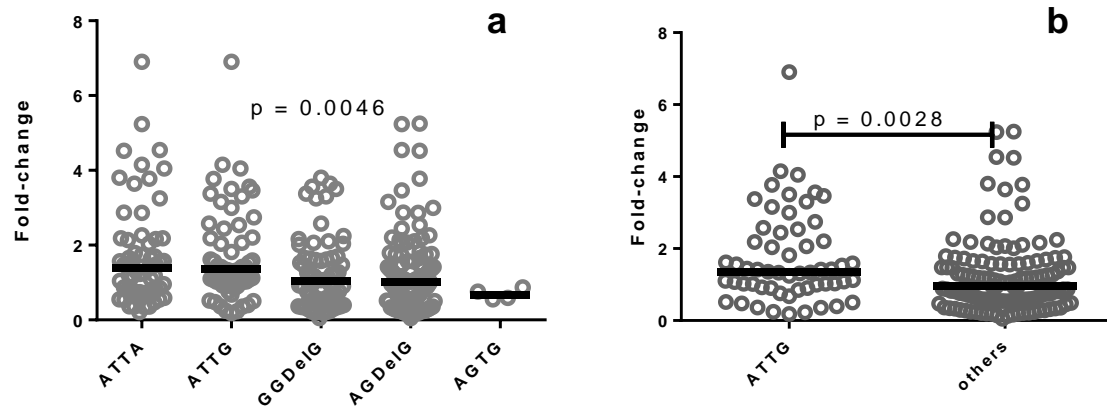
**Fig. 1**

Relative *CD33m* mRNA levels in healthy controls PBMC. Fold-change values were calculated through the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. The horizontal bars at the scatter plots indicate the median. SNPs that altered *CD33m+CD33M*, *CD33m* and/or *Var3* are shown, but the results are relative to *CD33m* mRNA levels. *P* values indicate a statistical significance at 0.05 level, and were calculated by Mann-Whitney's test



**Fig. 2**

Relative *CD33m* mRNA levels in healthy controls PBMC according to haplotypes harboring SNPs associated with differential expression of *CD33m* (*rs273640-rs3865444-rs2455069-rs34912427-rs35112940-rs1803254*). **a** Relative *CD33m* mRNA levels in carriers of different haplotypes. **b** Relative *CD33m* mRNA levels in carriers of the haplotype associated with higher susceptibility to PF. **c** Relative *CD33m* mRNA levels in carriers of the haplotype associated with lower susceptibility to PF. Fold-change values were calculated through the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. The horizontal bars at the scatter plots indicate the median. *P* values indicate a statistical significance at 0.05 level, and were calculated by Kruskal-Wallis test in **a**, and by Mann-Whitney's test in **b** and **c**



**Fig. 3**

Relative *CD33m* mRNA levels in healthy controls PBMC according to haplotypes harboring SNPs associated with differential expression of *CD33M+CD33m* (*rs3826656-rs3865444-rs34912427-rs35112940*). **a** Relative *CD33m* mRNA levels in carriers of different haplotypes. **b** Relative *CD33m* mRNA levels in carriers of the haplotype associated with higher susceptibility to PF. Fold-change values were calculated through the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. The horizontal bars at the scatter plots indicate the median. *P* values indicate a statistical significance at 0.05 level, and were calculated by Kruskal-Wallis test in **a**, and by Mann-Whitney's test in **b**

## Electronic supplementary material 1

**Table S1** - Frequencies of individuals that carry haplotypes harboring the 3 interacting *CD33* SNPs (*rs3826656-rs34912427-rs35112940*)

	Patients		Controls		OR	IC	P
	n	%	n	%			
<i>ATA</i>	49	14.2	50	16.4	0.8381	0.5462-1.286	0.4448
<i>ATG</i>	97	28	58	19.1	1.652	1.141-2.392	<b>0.0076</b>
<i>GDeIG</i>	76	22	69	22.7	0.9587	0.6622-1.388	0.8505
<i>ADeIG</i>	122	35.3	127	41.8	0.7591	0.5527-1.042	0.0903

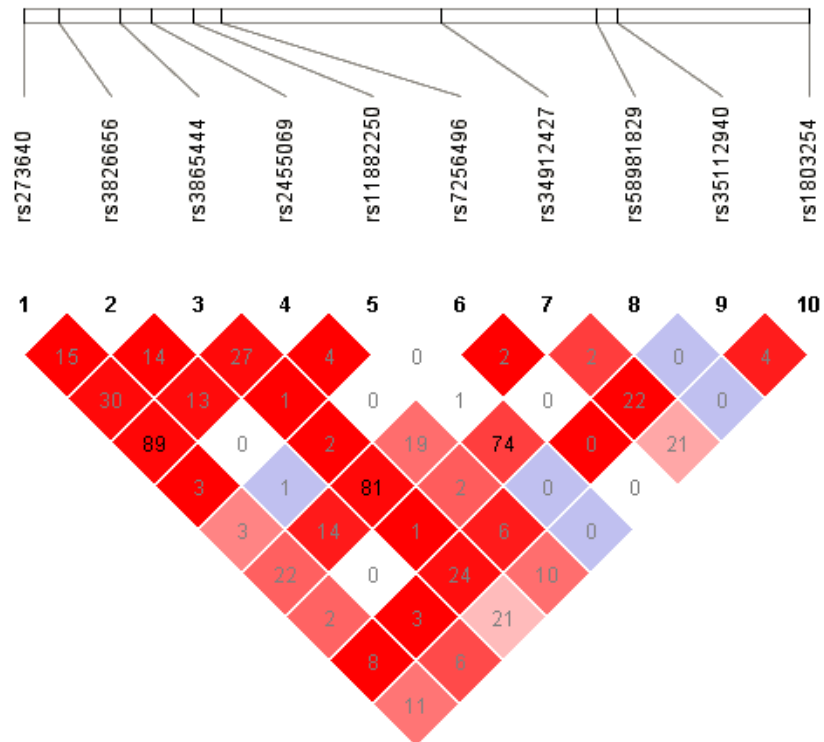
OR = odds ratio; CI = confidence interval; n=number of haplotypes; *P*=p-value. Bold values indicate a statistical significance at 0.05 level. The list of haplotypes does not include all possible haplotypes, since some are too infrequent for meaningful statistical analysis. The association analyses were performed using the sum of all other haplotypes as reference

## Electronic supplementary material 2

### Table S2 (EM FORMATO ELETRÔNICO)

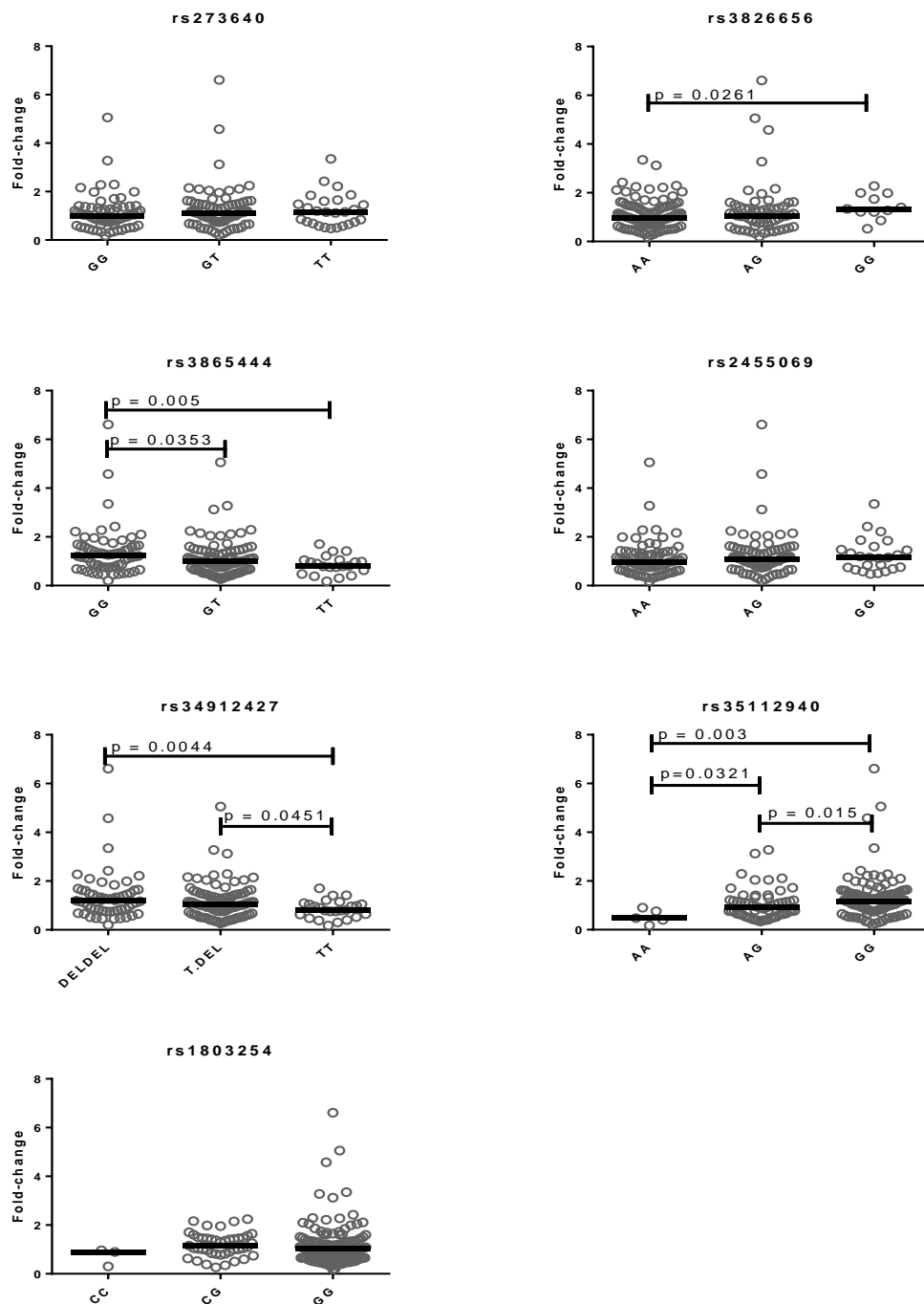
Predicted regulatory effects of *CD33* SNPs. Predicted regulatory effects of *CD33* SNPs. In this table we show the SNPs investigated in the study and SNPs in LD ( $D'$  and  $r^2 > 0.80$ ) in EUR (European), CEU (Northern European from Utah, USA), CLM (Colombian) and MXL (Mexican) populations of the 1000 Genomes project, their genomic positions and their predicted effects on DNA regulatory elements. Data was obtained using the HaploReg3 database, RegulomeDB, F-SNP, rSNPBase, SIFT, PolyPhen, miRNASNP, mirSNP and PolymiRTS. miRNA binding predictions tools were only consulted for SNPs in the 3'UTR region. LD results for *rs34912427* are based on the frequencies of AMR (admixed American) and EUR, since this SNP is not available in other populations of 1000 Genomes Database

## Electronic supplementary material 3

**Fig. S1**

Linkage disequilibrium plot based on pair wise LD SNP pairs distributed over the gene *CD33*. LD plot for the admixed total sample. The colors are indicative of D'/logarithm of odds (LOD), and values correspond to r<sup>2</sup>. Bright red color represents LOD ≥ 2 and D' = 1, shades of pink/red represents LOD ≥ 2 and D' < 1, blue color represents D' = 1 but LOD < 2, and white squares represent LOD < 2 and D' < 1. In this study, we defined high LD as D' and r<sup>2</sup> ≥ 0.80.

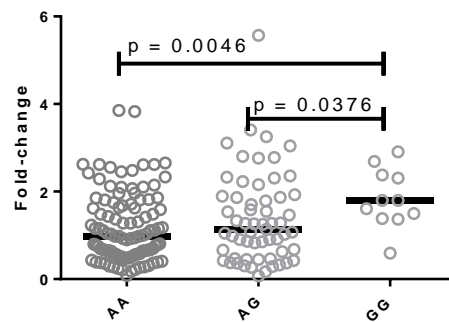
## Electronic supplementary material 4

**Fig. S2**

Relative *CD33M+CD33m* mRNA levels in healthy controls PBMC.

Fold-change values were calculated through the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. The horizontal bars at the scatter plots indicate the median. SNPs that altered *CD33 m+CD33M*, *CD33m* and/or *Var3* are shown, but the results are relative to *CD33m+CD33M* mRNA levels. P values indicate a statistical significance at 0.05 level, and were calculated by Mann-Whitney's test.

## Electronic supplementary material 5

**Fig. S3**

Relative *Var3* mRNA levels in healthy controls PBMC according to rs3826656 genotypes. Fold-change values were calculated through the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. The horizontal bars at the scatter plots indicate the median. *P* values indicate a statistical significance at 0.05 level, and were calculated by Mann-Whitney's test.

## 6. RESULTADOS ADICIONAIS E DISCUSSÃO FINAL

Em um estudo de expressão gênica global realizado pelo nosso grupo, vários genes localizados na região 19q13 se mostraram diferencialmente expressos em células T CD4+ de pacientes com PF e PV (MALHEIROS et al., 2014; resultados não publicados do nosso grupo). A região 19q13.4 contém o complexo receptor de leucócitos (LRC), um agrupamento de genes do sistema imune que codificam para receptores ativadores e inibidores semelhantes às imunoglobulinas expressos em células NK e outros leucócitos. A região que agrupa o LRC e outros genes em proximidade é conhecida como região do LRC estendido (BARROW; TROWSDALE, 2008). Associações importantes entre PF e genes *KIR*, localizados no LRC, já foram descritas pelo nosso grupo (AUGUSTO et al., 2012; AUGUSTO et al., 2015), o que evidencia a importância dessa região para a patogênese do PF. Além das associações com *KIR*, associações entre o PF e polimorfismos de outros genes contidos nessa região, como *LAIR2* e *CD33*, já foram descritas (CRUZ, 2013). *CD33* é significativamente mais expresso em PF, e *LAIR1*, homólogo de *LAIR2* e também localizado na região 19q13.4, é diferencialmente expresso em PV (MALHEIROS et al., 2014, resultados não publicados do nosso grupo). Além disso, pacientes de pênfigo apresentam autoanticorpos contra *CD33* (KALANTARI-DEHAGHI et al., 2011, 2013) e colágeno XVII, ligante de LAIR-1 e LAIR-2 (PAUS et al., 2006).

*CD33* é um receptor inibidor expresso principalmente em progenitores mieloides e em monócitos, e em algumas populações de células NK, T e B. *LAIR-1*, outro receptor inibidor, está por sua vez expresso na maioria dos leucócitos. *LAIR-2* é um receptor solúvel secretado principalmente por células T CD4+, homólogo a *LAIR-1*, que compete com este pelos mesmos ligantes. O nível sérico e plasmático de *LAIR-2* está aumentado em diversas doenças autoimunes, e esses níveis estão correlacionados diretamente com marcadores inflamatórios (LEBBINK et al., 2008; OLDE NORDKAMP et al., 2011; SIMONE et al., 2013). *CD33* e *LAIR-1* são marcadores de blastos leucêmicos (JURCIC, 2012; KANG et al., 2015). Ambos os receptores, quando ativados por seus ligantes, inibem a proliferação celular (MEYAARD, L., 2008; VITALE et al., 1999), induzem a apoptose de células mieloides (FERLAZZO et al., 2000; POGGI et al., 2000), e a redução de expressão desses receptores na superfície celular é acompanhada de um aumento da



secreção de citocinas pró-inflamatórias (LAJAUNIAS; DAYER; CHIZZOLINI, 2005; BONACCORSI et al., 2010). Estudos demonstram que a deficiência de LAIR-1 em células B e T está associada com doenças autoimunes, como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, e é acompanhada pela maior reatividade e proliferação dessas células (COLOMBO et al., 2012; ZHANG et al., 2014). A expressão de CD33 em linfócitos é pouco estudada, mas sabe-se que sua função também é supressora nessas células (HERNANDEZ-CASELLES et al., 2005; LAJAUNIAS et al., 2005; NOVAK, 2008). Diferentemente de LAIR-1 e LAIR-2, não temos conhecimento de estudos que relacionam CD33 diretamente com respostas autoimunes. Sabe-se que CD33 é um marcador de células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs), cuja expansão está associada com autoimunidade e respostas inflamatórias. No entanto, há vários estudos que relacionam os Siglecs, de maneira geral, com autoimunidade (CROCKER et al., 2007).

Em razão do papel que *CD33*, *LAIR1* e *LAIR2* desempenham no sistema imune e segundo os indícios que eles são importantes na patogênese do PF, nesse trabalho procuramos investigar se a expressão diferencial e polimorfismos desses genes interferem na susceptibilidade ao PF, e se a variação desses genes afeta níveis de RNAm. O presente capítulo trará uma discussão geral que integrará os resultados previamente apresentados nos manuscritos da seção "Artigos" (pg. 40) com resultados inéditos, com o intuito de realizar uma compreensão mais aprofundada do estudo e de sua relevância científica.

## 6.1. RESULTADOS ADICIONAIS

Um dos objetivos desse estudo foi investigar a relação entre expressão de RNAm de *LAIR1*, *LAIR2* e *CD33* e a patogênese do PF. Portanto, uma das primeiras questões a serem levantadas foi se a diferença dos níveis de expressão desses genes está associada ao risco de desenvolver a doença. Para tanto, nós investigamos os níveis de RNAm em PBMC de pacientes com pênfigo ativo sem tratamento (aPFNT), pacientes com pênfigo ativo sob tratamento (aPFTR), pacientes sem lesão (pênfigo inativo) sob tratamento (iPFTR), pacientes sem lesão sem tratamento (iPFNT) e controles saudáveis (CTRL) (FIGURAS 1 e 2). Não encontramos diferenças significativas entre os grupos quanto à expressão de *LAIR1* e *LAIR2*. Em relação à *CD33*, verificamos que os controles saudáveis apresentam

níveis mais altos dos transcritos *Var3* e *CD33m* em relação aos pacientes sem lesão sem tratamento. Todos os pacientes iPFNT são homozigotos para *rs3865444 G*, *rs34912427 Del*, *rs35112940 G* e *rs1803254 G*, alelos que conferem menor expressão de *CD33m*. Os controles saudáveis, por sua vez, são um grupo muito mais heterogêneo em relação aos genótipos dos mesmos loci, e isso aparentemente explica o resultado. No entanto, a variabilidade genética não explica a variação da expressão de *Var3*. Esses resultados podem ser artefatos do tamanho reduzido e/ou heterogeneidade da amostra com relação à posologia do tratamento ou tempo de remissão da doença, por exemplo. Portanto, esses resultados são inconclusivos e por essa razão não foram incluídos nos manuscritos.

Com o intuito de investigar associações entre polimorfismos e susceptibilidade ao PF, comparamos frequências alélicas, genóticas e de portadores de 6 polimorfismos de *LAIR1* (TABELA 1) e 8 polimorfismos de *LAIR2* (TABELA 2) entre pacientes de PF e controles. O grupo de controles encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os SNPs. Como previamente apresentado no primeiro manuscrito (pg. 45), encontramos dois polimorfismos de *LAIR1* (*rs56802430* e *rs11084332*) e um de *LAIR2* (*rs2287828*) associados com susceptibilidade ao PF, e diversos polimorfismos associados com a expressão desses genes em PBMC de indivíduos saudáveis (*rs3826753*, *rs74463408*, *rs3745444*, *rs56802430* associados com expressão de *LAIR1*, e *rs2277971* e *rs73070113* associados com expressão de *LAIR2*).

Testes de epistasia realizados no programa PLINK apontaram para interações entre 4 SNPs de *LAIR2* e nenhuma interação entre os SNPs de *LAIR1*, como já apontado no manuscrito na pg. 46. Apesar dos resultados negativos, realizamos análises estratificadas com os genótipos compostos pelos dois SNPs de *LAIR1* associados com o PF, *rs11084332* e *rs56802430* (TABELA 3), para investigar possíveis relações não evidenciadas pelas análises prévias realizadas no PLINK. Na amostra total, o efeito de proteção de *rs11084332 C+* é manifestado na presença de *rs56802430 G+* (OR=0.42, p=0.0408), e também na presença de *rs56802430 A/A* (OR=0.65, p=0.0508), apesar da falta de significância estatística. *rs56802430*, por sua vez, não apresenta associação sem o efeito de *rs11084332*. Não observamos nenhum resultado significativo na amostras formadas pelos indivíduos com ancestralidade predominantemente europeia (EU). Essas análises corroboram os resultados previamente apresentados no primeiro manuscrito, que

mostraram ausência de interação entre as variáveis de *LAIR1*. Também demonstram que não há efeito independente de nenhum SNP. As análises estratificadas realizadas com indivíduos da amostra total dos haplótipos formados pelos 6 SNPs de *LAIR1* corroboram esse resultado (dados não apresentados).

Além das análises apresentadas no primeiro manuscrito, inferimos frequências para os haplótipos formados por todos os SNPs de *LAIR1* e pelos SNPs associados com a expressão ao PF, na amostra total (TABELA 4) e em EU. O haplotipo número 5 (*GTACTCAC*) parece estar associado com proteção ao PF na amostra total (OR=0.58,  $p=0.0476$ ), no entanto a associação é muito fraca e os resultados inconclusivos. Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos em EU. Também inferimos frequências para os haplótipos formados pelos SNPs associados com expressão diferencial de *LAIR1*, e não encontramos associação na amostra total (TABELA 4) ou em EU. Adicionalmente, analisamos os diplótipos formados pelos dois SNPs de *LAIR1* associados com PF (TABELA 5). A proporção de portadores do diplótipo AC (*rs56802430-rs11084332*) é significativamente menor em pacientes do que em controles (OR=0.69,  $p=0.0008$  e OR=0.66,  $p=0.0176$  na amostra total e em EU, respectivamente), e a proporção de portadores de GT é maior em pacientes na amostra total (OR=1.52,  $p=0.0262$  e OR=1,52,  $p=0.1474$  na amostra total e em EU, respectivamente). Esses resultados apenas refletem as associações individuais dos SNPs, como pode ser observado pelos valores das associações.

Realizamos diversas análises para elucidar uma possível relação entre níveis de RNAm de *LAIR1* e susceptibilidade ao PF. Como previamente demonstrado no manuscrito na pg. 45, apenas o SNP *rs56802430* está associado com o PF e também com a expressão de *LAIR1*. No entanto nenhum haplótipo, tanto formado por todos os SNPs de *LAIR1* como pelos SNPs associados com a expressão de *LAIR1*, está associado com PF (dados não apresentados). Além dessas análises já apresentadas, investigamos a associação entre genótipos compostos e a suscetibilidade ao PF e expressão gênica de *LAIR1*. Verificamos que as frequências dos indivíduos portadores dos alelos associados com maior (*rs3826753* G+, *rs7446340* C/C, *rs3745444* T+, *rs56802430* G+) e menor (*rs3826753* A/A, *rs7446340* G+, *rs3745444* C/C, *rs56802430* A/A) expressão de *LAIR1* também não diferem entre pacientes e controles (dados não apresentados). Verificamos também que portadores do primeiro genótipo composto apresentam

maior expressão de *LAIR1* com relação a não-portadores, mas a diferença não é significativa. O genótipo composto pelos alelos associados com menor expressão de *LAIR1* não pôde ser investigado com relação à expressão gênica em razão da baixa frequência em nossa amostra de controles (dados não apresentados). Concluimos, portanto, que não há relação entre a expressão de RNAm de *LAIR1* e susceptibilidade ao PF.

Como apresentado previamente no manuscrito na pg. 46, haplótipos formados pelos SNPs que interagem de *LAIR2* estão associados com o PF. Além desses haplótipos, analisamos os haplótipos formados por todos os SNPs de *LAIR2* (TABELA 6) na amostra total e em EU. A associação observada do haplótipo 13 (OR=4.116,  $p=0.002$ , amostra total) com o PF é reflexo da associação do haplótipo *GTCA*, como descrito previamente. Com o objetivo de verificar efeitos independentes dos SNPs nos haplótipos, realizamos análises estratificadas dos mesmos e verificamos que *rs2287828* (o único SNP de *LAIR2* associado com PF nas análises individuais de associação) têm efeito independente sobre os outros SNPs de *LAIR2* (*GCACTCAC* vs. *GTACTCAC*, OR=0.194,  $p=0.0005$ , amostra total).

Diversas análises foram realizadas para investigar a relação entre níveis de RNAm de *LAIR2* e susceptibilidade ao PF. Verificamos que o genótipo composto e o haplótipo - formado pelos 4 SNPs que interagem - que estão associados com maior susceptibilidade ao PF estão também associados com maior expressão de *LAIR2*, como demonstrado no manuscrito na pg. 46. No entanto, os genótipos compostos *rs2277971 C/T*, *rs73070113 A/A* e *rs2277971 T/T*, *rs73070113 A/T*, significativamente associados com menor ( $p=0.001$ ) e maior ( $p<0.0001$ ) expressão de *LAIR2*, não contribuem para susceptibilidade ao PF (dados não apresentados). Esses dois SNPs são associados com a expressão de *LAIR2*. Além disso, inferimos frequências para os diplótipos formados por esses dois SNPs (TABELA 7, amostra total), e não observamos nenhum associado com PF (também não observamos resultado significativo em EU). Assim, esses resultados nos permitem concluir que a maior expressão de *LAIR2* relacionada ao PF está condicionada à presença de certos alelos e em combinações específicas.

As frequências alélicas, genotípicas e de portadores para todos os SNPs de *CD33* estão apresentados na TABELA 8. O grupo de controles encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os SNPs. Como demonstramos no segundo manuscrito da seção Artigos, na pg. 61, quatro variantes de *CD33*

(*rs273640*, *rs2455069*, *rs3865444* e *rs1803254*) estão associadas com o PF na amostra total, e 3 (*rs273640*, *rs2455069* e *rs1803254*) em EU. Nem todas as associações são independentes, já que *rs273640* e *rs2455069* estão em desequilíbrio de ligação, assim como *rs3865444* e *rs34912427*. Além disso, demonstramos que três polimorfismos que não apresentam associação com o PF nas análises individuais - *rs3826566*, *rs34912427* e *rs35112940*, interagem entre si e estão associados com o PF em análises estratificadas, dados que apresentamos na p. 66, no segundo manuscrito. Além dessas análises, realizamos análises estratificadas 2x2 na amostra total e em EU com os SNPs associados com PF, para investigar possíveis interações não identificadas pelo software (TABELA 9 para análises em EU, dados não mostrados para amostra total). Aparentemente, *rs3865444* interage com *rs2455069* e *rs273640*. O efeito dominante protetor de *rs273640 T* se manifesta apenas na presença de *rs3865444 T* (OR=0.56, p=0.0197 na amostra total, e OR=0.41, p=0.006 em EU), assim como *rs2455069 G* apenas se manifesta na presença de *rs3865444 T* (OR=0.50, p=0.024 em EU). No entanto, em nenhum dos casos a OR é significativamente menor em relação às análises individuais. Não foi possível realizar análises estratificadas para *rs2455069* e *rs273640* em razão da pequena frequência de alguns genótipos. Quando analisamos os genótipos associados em conjunto, verificamos que os efeitos individuais são intensificados quando *rs1803254 G* está presente com *rs2455069 G* (OR=0.27, p=0.0114), *rs3865444 G* (OR=0.17, p=0.0125) e *rs2455069 T* (OR=0.26, p=0.0117). Essas comparações, no entanto, envolvem um número limitado de indivíduos e como consequência os intervalos de confiança dos valores das associações são muito amplos. Portanto, esses resultados são inconclusivos e não se pode concluir que há, de fato, interação entre esses SNPs.

Conforme apresentado no manuscrito de *CD33*, realizamos análises haplotípicas com os SNPs associados com a expressão de *CD33M+CD33m* e *CD33m*, e verificamos que os haplótipos associados com maior susceptibilidade ao PF estão também associados com maior expressão de *CD33m*, e vice-versa, assim como acontece para genótipos associados. Adicionalmente, realizamos análises de associação com os haplótipos contendo todos os SNPs de *CD33* (TABELA 10) e aqueles formados pelos SNPs associados com PF (TABELA 11). O haplótipo número 5 (*GATATATGGC*), está associado com maior susceptibilidade ao PF em EU e na amostra total (OR=1.485, p=0.017 e OR=2.081, p=0.001, respectivamente).

Esse é o único haplótipo frequente (frequência maior que 1% em controles e pacientes) que contém todos os alelos associados com maior susceptibilidade ao PF. Esse haplótipo também está associado com maior expressão de *CD33m* (portadores vs. não-portadores, 1.42 vs. 1.03-fold,  $p=0.0079$ ). O haplótipo número 8 (*TAGGTGDeIGGG*), que contém os alelos menos frequentes em pacientes, está por sua vez associado com menor susceptibilidade ao PF em EU e na amostra total (OR=0.22,  $p=0.0144$  e OR=0.06,  $p=0.0106$ , respectivamente). Não foi possível avaliar a expressão desse haplótipo, pois ele não está presente na nossa amostra de controles. Com relação aos haplótipos formados pelos SNPs associados ao PF, constatamos que portadores de *GTAC* apresentam maior susceptibilidade ao PF na amostra total e em EU (OR=1.45,  $p=0.0031$  e OR=1.92,  $p=0.0255$  respectivamente) em relação a não portadores. Há uma frequência menor de pacientes portadores do haplótipo *TGGG* na amostra EU (OR=0.64,  $p=0.008$ ) com relação a controles, mas a comparação não foi significativa na amostra total. Com relação à expressão, os haplótipos *GTAC* e *TGGG* estão significativamente associados com maior e menor expressão de *CD33m* (FIGURA 3).

À parte das análises previamente descritas, nos perguntamos se o número de genótipos de proteção ou de susceptibilidade estaria relacionado a menor/maior susceptibilidade ao PF em relação a análises individuais. Para isso, comparamos entre pacientes e controles as frequências dos indivíduos portadores de 3 ou mais genótipos de susceptibilidade com as frequências daqueles portadores de apenas 1 ou 2 genótipos de susceptibilidade, e verificamos que o risco não aumenta ou diminui em relação às análises individuais. As mesmas análises foram realizadas com haplótipos, e os resultados foram similares.

Como descrito no manuscrito de *CD33*, pg. 61, adicionamos todas as variáveis com PF em um modelo de regressão logística, e verificamos que *rs272640 T+* é a variável independente em EU e *rs1803254 C/C* é independente na amostra total. *rs1803254* apresenta  $r^2$  e  $D'$  próximos a zero com todos os demais SNPs de *CD33*. Mesmo alguns dos valores de  $r^2$  e  $D'$  sendo baixos entre outros SNPs de *CD33*, a presença de maior desequilíbrio de ligação (DL) associado a diferenças de intensidade do efeito sobre PF (força da associação) explicam o resultado diferencial entre as amostras. Nenhuma dessas variáveis corresponde a maior diferença de expressão de *CD33m*, o que pode significar que essas variantes afetam,

diretamente ou via SNPs em DL, outros níveis moleculares que não a expressão de RNAm.

Em nenhuma das análises haplotípicas ou de genótipos compostos, descritas nesse capítulo ou no manuscrito, houve sobreposição entre associação com PF e associação com expressão variável de *CD33M+CD33m* ou *Var3*. No entanto, a expressão de *CD33m* parece ser inversamente proporcional àquela de *CD33M+CD33m*. Os resultados são claros em relação a *CD33m*: provavelmente níveis elevados de *CD33m* são um fator de risco ao PF.

Por fim, utilizamos diversas ferramentas de bioinformática (APÊNDICE 2 – MATERIAIS E MÉTODOS, TABELA 4) para melhor investigar o papel funcional dos SNPs de *CD33*, *LAIR1* e *LAIR2*. Os resultados estão sumarizados nas *SUPPLEMENTARY TABLE S1* (*LAIR1* e *LAIR2*) e *SUPPLEMENTARY TABLE S2* (*CD33*) e previamente citadas nos artigos. A TABELA 12 sumariza as principais informações obtidas das análises funcionais *in silico*, além de conter informações relevantes sobre os SNPs (associações com outras doenças e resultados de análises de expressão) provenientes de outros estudos.

## 6.2. DISCUSSÃO

Constatamos que polimorfismos de *LAIR1*, *LAIR2* e *CD33* interferem nos níveis de RNAm. Realizamos análises bioinformáticas (TABELA SUPLEMENTAR TABLE S1 – *LAIR1* e *LAIR2*; TABELA SUPLEMENTAR TABLE S2 – *CD33*, ambas em formato eletrônico apenas) para tentar identificar os possíveis SNPs funcionais, e apontamos para vários candidatos. Idealmente, o papel desses SNPs na regulação da expressão gênica deve ser validado através de estudos funcionais.

Polimorfismos de *LAIR1* contribuem para susceptibilidade ao PF, mas aparentemente os níveis de RNAm não estão relacionados com a patogênese da doença. Não podemos descartar a relação entre expressão proteica de *LAIR1* e PF. Já foi relatado que a expressão variável de *LAIR1* na superfície celular não é acompanhada da variação nos níveis de RNAm (JANSEN et al., 2007) e além disso sabe-se que níveis de RNAm e proteína não são sempre diretamente relacionados. Portanto, os polimorfismos associados com PF podem estar associados com alterações a nível de RNAm cujas consequências não possam ser mensuradas

através de PCR quantitativa (alteração da estrutura secundária do RNAm, por exemplo) ou até mesmo com alteração da expressão proteica de *LAIR1*.

Polimorfismos de *LAIR2* também influenciam na susceptibilidade ao PF, e aparentemente a maior expressão do gene está também associada com maior susceptibilidade à doença. Nossos resultados com relação à expressão de *LAIR2* e PF vão ao encontro a diversos estudos que relatam níveis elevados de LAIR-2 em pacientes com doenças autoimunes (LEBBINK et al., 2008; OLDE NORDKAMP et al., 2011; SIMONE et al., 2013).

CD33 tem atividade repressora em monócitos, e a inibição de sua interação com ligantes e o silenciamento do gene resultam em ativação monocítica e aumento da secreção das citocinas próinflamatórias IL-1- $\beta$ , IL-8 e TNF- $\alpha$ . O infiltrado inflamatório em lesões de PF inclui diversos tipos celulares, entre eles monócitos (Nestor et al. 1987; Grando et al. 1989; D'Auria et al. 1997; Santi and Sotto 2001), que participam do desencadeamento e manutenção de respostas autoimunes através de suas funções na fagocitose e produção de citocinas (AHMAD, 2007; KATSIARI et al., 2010; NICHOLSON et al., 2009; SON; DIAMOND, 2015). Níveis elevados de citocinas próinflamatórias são encontrados em PBMC, soro e lesões de pacientes de pênfigo (RODRIGUES et al., 2009). IL-1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  são importantes mediadores imunoregulatórios envolvidos diretamente com doenças inflamatórias, tais como a artrite reumatoide (KAY; CALABRESE, 2004). IL-8 é uma citocina com potencial quimioatrativo, envolvida principalmente no recrutamento de fagócitos polimorfonucleares (BAGGIOLINI et al., 1994). Níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-8 são observados em lesões de pênfigo (Feliciani *et al.* 2000; O'Toole *et al.* 2000; López-Robles *et al.* 2001), e níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 são observados no soro de pacientes (D'AURIA et al., 1997; BARONI et al., 2002; BHOL et al., 2001). A expressão de TNF- $\alpha$  pode ser induzida por Ig de PV (Feliciani *et al.* 2000; López-Robles *et al.* 2001). TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  podem exacerbar o processo de acantólise através da indução do ativador de plaminogênio do tipo uroquinase (BECHTEL et al., 1996; BURGE et al., 1992; FELICIANI et al., 2000), e indução da secreção do fator quimiotático e ativador de monócitos (MCAF) e IL-8 por fibroblastos e células epiteliais (KASAHARA et al., 1991; LARSEN et al., 1989). Além disso, camundongos *knockout* para IL- $\beta$  e TNF- $\alpha$  tem menor suscetibilidade para desenvolver pênfigo (FELICIANI et al., 2000). IL- $\beta$  também influencia o processo de formação de lesões ao estimular a expressão de moléculas de adesão celular (Groves, 1992 *apud*



Rocha-Rodrigues *et al.* 2003). TNF- $\alpha$  e IL-1 também apresentam um papel indireto em PV ao induzir a sobrevida de células B, proliferação de células T e produção de anticorpos (BACHER *et al.*, 1996; MORAND, 2005; NAMAZI *et al.*, 2010); além disso, TNF- $\alpha$  induz a ativação do complemento (FELICIANI *et al.*, 1999). A ativação local do complemento recruta e ativa células inflamatórias e amplifica a lesão tecidual. A apoptose está diretamente envolvida com a acantólise, e células fagocíticas CD14+ e células apoptóticas estão aumentadas na derme de pacientes de PV. A fagocitose *in vitro* de queratinócitos apoptóticos por monócitos resulta no aumento de produção de TNF- $\alpha$ , que por sua vez exacerba o processo de apoptose (CHIAPA-LABASTIDA *et al.*, 2011). Portanto, diversos estudos evidenciam o importante papel que os monócitos apresentam no processo acantolítico e nas respostas inflamatórias.

Verificamos que polimorfismos de *CD33* contribuem para a susceptibilidade ao PF, e que a maior/menor expressão de *CD33m* está relacionada com maior/menor susceptibilidade ao PF. Vários cenários são possíveis para explicar a relação entre a expressão de *CD33* e a susceptibilidade ao PF. É plausível que a menor expressão de *CD33m* e maior expressão de *CD33M+CD33m* (apesar de não significativa) que observamos em relação a alguns genótipos esteja relacionada com maior expressão de *CD33M* na superfície de monócitos. Nesse caso, *CD33m* pode ser uma variante que codifica uma proteína instável, e por isso a diferença de expressão não seja detectável a nível de proteína, como descrito por Raj *et al.* (2014). A ligação de *CD33M* em monócitos com ácidos siálicos leva à inibição da proliferação celular e funções celulares e, portanto, diminuição da secreção de citocinas pro-inflamatórias, que por sua vez contribuiriam para o agravamento e estabelecimento das lesões no contexto do PF.

A maior expressão de *CD33m* - uma isoforma potencialmente não-funcional - na superfície dessas células, por sua vez, poderia exacerbar respostas imunes no contexto do PF, pois *CD33m* poderia competir por ligantes com *CD33M* e resultar em inibição das funções regulatórias de *CD33M*. Não podemos descartar, entretanto, a possibilidade que *CD33m* seja funcional e apresente um papel ainda não desvendado.

De maneira semelhante a *CD33M*, a maior expressão de LAIR-1 em células do sistema imune também poderia ajudar a controlar o quadro patológico do PF, mas nossos resultados não apontaram para uma relação entre expressão do gene e

susceptibilidade ao PF. No mesmo contexto, é possível que a expressão diminuída de LAIR-2 possa resultar na diminuição do agravamento do quadro inflamatório em PF, já que a função inibitória de LAIR-1 não seria enfraquecida pela menor abundância de ligantes. Alternativamente, a maior expressão de LAIR-2 e menor expressão de LAIR-1 e CD33 permitiriam um agravamento das condições patológicas da doença.

Não há muitos estudos sobre a expressão e função de CD33 em células linfoides. CD33 tem atividade também repressora em células NK (HERNANDEZ-CASELLES et al., 2005), e células NK CD33+ apresentam menor atividade citolítica contra seus alvos quando comparadas com células CD33- (HANDGRETINGER et al., 1993). A função ativadora de KIR em células NK está associada com menor susceptibilidade ao PF (AUGUSTO, DANILLO G. et al., 2012); portanto, no contexto de células NK, a menor expressão de CD33M deveria ter um efeito protetor.

Malheiros et al. (2014) demonstrou que níveis de RNAm de *CD33* estão aumentados aproximadamente 3 vezes em células T CD4+ de pacientes PF com lesões generalizadas. Os poucos estudos de CD33 em células T demonstram a proporção de células T CD4+CD33+ pode aumentar para até 95% do total de células quando populações de linfócitos são estimuladas (HERNANDEZ-CASELLES et al., 2005; NAKAMURA et al., 1994). Outros estudos demonstraram que células T CD4+ CD33+ secretam altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- $\gamma$ , crescem sob um perfil de citocinas do tipo Th2, inibem a proliferação de células T e apresentam marcadores de Treg (NOVAK, 2008; VOLOSHIN-SELA, 2009).

Células Treg podem ser divididas em subgrupos segundo a expressão diferencial de marcadores de superfície e a variedade de mecanismos supressores empregados (KOCH et al., 2009). A maioria das células Treg mantém a expressão de Foxp3, enquanto que um subgrupo de Tregs instáveis CD4+CD25-Foxp3+ expressam menos Foxp3 e são menos anérgicas e menos supressoras do que as populações de Treg CD4+CD25+Foxp3+. Essas subpopulações de Treg instáveis são capazes de adotar um perfil Th ou voltar a expressar Foxp3 depois de estimuladas (KOMATSU et al., 2009). O desequilíbrio entre proporções de subpopulações de Treg especializadas está associado com doenças autoimunes (DUHEN et al., 2012) como diabetes tipo-1 (MCCLYMONT et al., 2011), esclerose múltipla (DOMINGUEZ-VILLAR; BAECHER-ALLAN; HAFLER, 2011) e esclerose sistêmica (MACDONALD et al., 2015). Nessas doenças, Treg produtoras de IFN- $\gamma$

estão presentes em maiores proporções em pacientes em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, na esclerose múltipla essas células têm efeito supressor diminuído se comparadas com Tregs de indivíduos saudáveis (DOMINGUEZ-VILLAR et al., 2011). Recentemente, foi reportado um caso de células Treg do tipo Th2 envolvidas com autoimunidade (MACDONALD et al., 2015). Os autores investigaram células Treg no sangue e pele de pacientes com esclerose sistêmica e em indivíduos saudáveis, e verificaram que células Treg circulantes de pacientes não produzem citocinas do tipo Th2, mas apresentam maior proporção de subtipos celulares que expressam receptores de citocinas do tipo Th2 e receptores *skin-homing*. As células Treg da pele de pacientes, no entanto, produzem altos níveis de citocinas Th2 IL-4 e IL-13.

No PF, células T CD4+ reativas à DSG1 produzem um perfil de citocinas do tipo Th2 (LIN, M.-S. et al., 2000), e há menor proporção de células Treg circulantes em PV e PF (CIPOLLA, 2012; SUGIYAMA et al., 2007). No entanto, os níveis de Foxp3 são elevados em lesões de PF, indicando que as Tregs presentes nesses locais são insuficientes ou ineficientes para controlar as respostas imunes da doença (MALHEIROS et al., 2014b). Assim, é plausível que no PF haja uma maior proporção de células Treg CD4+CD25-CD33+, com menos poder supressivo do que células Treg normais, e que secretam citocinas típicas de células Th2. Essas células poderiam contribuir para a patologia do PF, ou surgir em resposta à uma resposta Th2 e com o papel de controlar respostas Th2 exacerbadas.

Apesar de predominantemente expresso em Tregs, CD33 está também expresso em na superfície de células efectoras antígeno-específicas CD4+CD25-Foxp3+. Essas células expressam mais Foxp3 do que os subtipos CD4+CD25-Foxp3+CD33low (PROBST-KEPPER et al., 2009). Pacientes de lupus eritematosos sistêmico expressam maiores proporções de linfócitos T CD4+CD25-Foxp3+, e existem evidências de que algumas subpopulações possam ser de células T CD4+ ativadas que expressam Foxp3, mas que não tem atividade supressora (HORWITZ, 2010; BONELLI et al., 2014). Com já foi descrito, a proporção de células T CD4+CD33+ aumenta em resposta à estimulação de linfócitos (HERNANDEZ-CASELLES et al., 2005; NAKAMURA et al., 1994). Como pacientes de PF têm uma proporção elevada de células CD4+ Th2 (LIN, M.-S. et al., 2000), é possível que em pacientes haja uma maior proporção de células T efectoras e ativadas CD4+CD25-

CD33+ ou CD4+CD25+CD33+, o que explicaria a maior expressão de CD33 observada em pacientes.

Considerando o efeito inibidor de LAIR-1 e o fato que a deficiência de expressão do receptor em diversos tipos celulares está relacionada com doenças autoimunes (COLOMBO et al., 2012; ZHANG et al., 2014), seria mais intuitivo assumir que a menor expressão de *LAIR1* em células T CD4+ em pênfigo estaria relacionada com maior susceptibilidade à doença. No entanto, *LAIR1* é 1,7 vez mais expresso em linfócitos T CD4+ de pacientes com PV em relação a controles sadios (MALHEIROS et al., 2014). A regulação da expressão de LAIR-1 em células T ainda não é bem compreendida. Estudos demonstram que LAIR-1 pode ter a expressão diminuída (JANSEN et al., 2007; ZHANG et al., 2014) ou aumentada (MAASHO et al., 2005) na superfície de células T segundo o tipo de estímulo. Além disso, a função inibidora de LAIR-1 também ocorre em certos subtipos de células T e sob estímulos específicos (MEYAARD et al., 1999; POGGI et al., 1997). É possível, portanto, que diferentes estímulos no contexto do pênfigo possam resultar em maior expressão de RNAm de *LAIR1* em subtipos específicos de células T CD4+.

Em uma aparente contradição dos efeitos inibidores de LAIR1, foi demonstrado que camundongos knockout para *LAIR1* apresentam deficiência na troca de isotipo para IgG2a e IgG2b (TANG et al., 2012). Assim, se LAIR-1 humano também influencia a produção de anticorpos de isotipos específicos, uma maior expressão de LAIR-1 poderia resultar em produção exacerbada de anticorpos patogênicos.

*LAIR1* possui diferentes variantes de RNAm, e aquela detectada em PV é *LAIR1b* (NM\_021706). Esse transcrito não possui um éxon que codifica um segmento entre a região transmembrana e a região receptor. Esse segmento faltante pode afetar a glicosilação da proteína e/ou afetar a ligação com colágenos, apesar de ter sido demonstrado que LAIR1-b é tão funcional quanto LAIR1-a, a isoforma intacta (MEYAARD et al., 1997, 1999). Portanto, é possível que níveis dessa isoforma truncada de LAIR-1 sejam mais elevados em PV, e que isso contribua para a patogênese da doença.

Os resultados aqui reportados contribuem para o nosso entendimento da patogênese do PF, mas não nos permitem concluir se os genes estudados estão relacionados causalmente com o desenvolvimento do PF, ou se estão apenas envolvidos com o estabelecimento da doença. Uma das limitações desse estudo é o

tamanho limitado da amostra de pacientes com a qual foi realizado o estudo de expressão gênica, que acabou por ser inconclusivo. Essa amostra é bastante heterogênea, pois apesar de termos pareado a amostra em relação ao sexo, idade e tratamento dos indivíduos, a extensão da lesões, o tempo em remissão e a etnia dos pacientes não foram considerados, além de múltiplos fatores ambientais que sabidamente podem afetar a expressão gênica. Com relação ao tamanho reduzido da amostra de PF para o estudo de expressão gênica, destacamos que esse trabalho incluiu a coleta de todo o material biológico utilizado nas análises, exceto o DNA utilizado nas análises de associação. Além disso, a coleta de material biológico de PF é laboriosa, pois envolve o deslocamento até as áreas endêmicas, e os pacientes não são numerosos. O fato de termos realizado os estudos de expressão gênica em PBMC também foi um limitante, pois a heterogeneidade na composição de PBMC limita o poder de detecção de padrões de expressão em grupos celulares específicos. Realizamos um grande número de análises, que traz como consequência a possibilidade de falso positivos (BALDING, 2006), no entanto decidimos por não ajustar os valores de  $P$  pelo método clássico de Bonferroni por este ser muito conservador (BALDING, 2006; ZINTZARAS; LAU, 2008).

Apesar das limitações, nossos resultados nos permitem concluir que polimorfismos de *LAIR1*, *LAIR2* e *CD33* participam da regulação da expressão gênica. Além disso, estudos de associação sugerem que os três genes desempenham um papel na patogênese do PF. Os resultados sugerem fortemente que a expressão de RNAm de *CD33* e de *LAIR2* em PBMC está relacionada com susceptibilidade do PF. Vários dos nossos resultados replicam estudos anteriores ou vão ao encontro a resultados produzidos por outros grupos que demonstram o importante papel desempenhado por esses genes na autoimunidade e nas respostas inflamatórias. Portanto, estudos funcionais são necessários para esclarecer o papel desses genes na patogênese do PF. Além disso, estudos de expressão gênica e proteica focados em tipos celulares específicos e com amostras maiores de pacientes e controles saudáveis são necessários para que as relações entre *CD33*, *LAIR1* e *LAIR2* e a patogênese do PF sejam melhor esclarecidas.

## 7. CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem constatar que:

- Os polimorfismos *rs3826753*, *rs74463408*, *rs3745444* e *rs56802430* de *LAIR1*; *rs73070113* e *rs2277971* de *LAIR2*; e *rs273640*, *rs3826656*, *rs3865444*, *rs2455069*, *rs34912427*, *rs35112940* e *rs1803254* de *CD33* estão associados à regulação dos níveis de RNAm dos respectivos genes.
- Os polimorfismos *rs56802430* e *rs11084332* de *LAIR1*; *rs2287828* de *LAIR2*; e *rs273640*, *rs3865444*, *rs2455069*, e *rs1803254* de *CD33* estão associados com o PF.
- Quatro SNPs de *LAIR2* - *rs2042287*, *rs2287828*, *rs2277974* e *rs114834145* são epistáticos e associados com o PF em combinações específicas, assim como os SNPs *rs3826566*, *rs34912427* e *rs35112940* de *CD33*.
- Diversos SNPs são funcionalmente relevantes, ou estão em DL com aqueles relevantes, segundo anotação funcional *in silico*.
- A expressão diferencial de RNAm de *LAIR1* em PBMC não influencia na susceptibilidade ao PF.
- Níveis elevados de *CD33m* e de *LAIR2* em PBMC provavelmente estão relacionados com maior susceptibilidade ao PF.

## REFERÊNCIAS

ABRÉU-VÉLEZ, A. M.; ROSELINO, A. M.; HOWARD, M. S.; DE MESSIAS REASON, I. J. Endemic pemphigus over a century: Part II. **North American journal of medical sciences**, v. 2, n. 3, p. 114, 2010.

AHMAD, S. Autoimmunity: Monocytes take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 659–659. doi: 10.1038/nri2166, 2007.

AMAGAI, M.; KARPATI, S.; PRUSSICK, R.; KLAUS-KOVTUN, V.; STANLEY, J. R. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. **The Journal of clinical investigation**, v. 90, n. 3, p. 919–926. doi: 10.1172/JCI115968, 1992.

ANGULO, J. J. Attempts to isolate a virus from pemphigus foliaceus cases. **A.M.A. Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 69, n. 4, p. 472–474, 1954.

AOKI, V.; HUANG, M. H. T.; PÉRIGO, A. M.; et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) and pemphigus vulgaris: immunoglobulin G heterogeneity detected by indirect immunofluorescence. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 59, n. 5, p. 251–256. doi: 10.1590/S0041-87812004000500005, 2004b.

AOKI, V.; MILLIKAN, R. C.; RIVITTI, E. A.; et al. Environmental Risk Factors in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 9, n. 1, p. 34–40. doi: 10.1111/j.1087-0024.2004.00833.x, 2004a.

AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A.; THE COOPERATIVE GROUP ON FOGO SELVAGEM RESEARCH. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. **The Journal of Dermatology**, v. 42, n. 1, p. 18–26. doi: 10.1111/1346-8138.12675, 2015.

AOKI, V.; SOUSA, J. X.; DIAZ, L. A.; COOPERATIVE GROUP ON FOGO SELVAGEM RESEARCH. Pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 3, p. 413–418, viii. doi: 10.1016/j.det.2011.03.014, 2011.

ARREDONDO, J.; CHERNYAVSKY, A. I.; KARAOUNI, A.; GRANDO, S. A. Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in Pemphigus. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 6, p. 1531–1544. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61239-4, 2005.

AUGUSTO, D. G.; LOBO-ALVES, S. C.; MELO, M. F.; PEREIRA, N. F.; PETZLER-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, n. 7, p. e39991. doi: 10.1371/journal.pone.0039991, 2012.

AUGUSTO, D. G.; O'CONNOR, G. M.; LOBO-ALVES, S. C.; et al. Pemphigus is associated with KIR3DL2 expression levels and provides evidence that KIR3DL2 may bind HLA-A3 and A11 in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 7, p. 2052–2060. doi: 10.1002/eji.201445324, 2015.

D'AURIA, L.; BONIFATI, C.; MUSSI, A.; et al. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. **European Cytokine Network**, v. 8, n. 4, p. 383–387, 1997.

BACHER, M.; METZ, C. N.; CALANDRA, T.; et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 15, p. 7849–7854, 1996.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. **Advances in Immunology**, v. 55, p. 97–179, 1994.

BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 10, p. 781–791. doi: 10.1038/nrg1916, 2006.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; PAOLETTI, I.; et al. Pemphigus serum and captopril induce heat shock protein 70 and inducible nitric oxide synthase overexpression, triggering apoptosis in human keratinocytes. **British Journal of Dermatology**, v. 150, n. 6, p. 1070–1080. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.05919.x, 2004.

BARONI, A.; PERFETTO, B.; RUOCCO, E.; et al. Cytokine pattern in blister fluid and sera of patients with pemphigus. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, v. 205, n. 2, p. 116–121. doi: 63895, 2002.

BARRETT, J. C.; CLAYTON, D. G.; CONCANNON, P.; et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. **Nature Genetics**, v. 41, n. 6, p. 703–707. doi: 10.1038/ng.381, 2009.

BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457, 2005.

BARROW, A. D.; TROWSDALE, J. The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. **Immunological Reviews**, v. 224, p. 98–123. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00653.x, 2008.

BECHTEL, M. J.; REINARTZ, J.; ROX, J. M.; et al. Upregulation of Cell-Surface-Associated Plasminogen Activation in Cultured Keratinocytes by Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . **Experimental Cell Research**, v. 223, n. 2, p. 395–404. doi: 10.1006/excr.1996.0094, 1996.

BERKOWITZ, P.; HU, P.; LIU, Z.; et al. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization.



**The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23778–23784. doi: 10.1074/jbc.M501365200, 2005.

BERNSTEIN, I. D. CD33 as a Target for Selective Ablation of Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Lymphoma**, v. 2, Supplement 1, p. S9–S11. doi: 10.3816/CLM.2002.s.002, 2002.

BHATTACHARYA, A.; ZIEBARTH, J. D.; CUI, Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D86–91. doi: 10.1093/nar/gkt1028, 2014.

BHOL, K. C.; DESAI, A.; KUMARI, S.; COLON, J. E.; AHMED, A. R. Pemphigus Vulgaris: The Role of IL-1 and IL-1 Receptor Antagonist in Pathogenesis and Effects of Intravenous Immunoglobulin on Their Production. **Clinical Immunology**, v. 100, n. 2, p. 172–180. doi: 10.1006/clim.2001.5061, 2001.

BOILARD, E.; NIGROVIC, P. A.; LARABEE, K.; et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5965, p. 580–583. doi: 10.1126/science.1181928, 2010.

BOLLAND, S.; RAVETCH, J. V. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. **Immunity**, v. 13, n. 2, p. 277–285, 2000.

BONACCORSI, I.; CANTONI, C.; CARREGA, P.; et al. The Immune Inhibitory Receptor LAIR-1 Is Highly Expressed by Plasmacytoid Dendritic Cells and Acts Complementary with Nkp44 to Control IFN $\alpha$  Production. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11. doi: 10.1371/journal.pone.0015080, 2010.

BONELLI, M.; GÖSCHL, L.; BLÜML, S.; et al. CD4+CD25-Foxp3+ T cells: a marker for lupus nephritis? **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 2, p. R104. doi: 10.1186/ar4553, 2014.

BORTHAKUR, G. Precision “re”arming of CD33 antibodies. **Blood**, v. 122, n. 8, p. 1334. doi: 10.1182/blood-2013-06-509638, 2013.

BOYLE, A. P.; HONG, E. L.; HARIHARAN, M.; et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797. doi: 10.1101/gr.137323.112, 2012.

BRADSHAW, E. M.; CHIBNIK, L. B.; KEENAN, B. T.; et al. CD33 Alzheimer’s disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 848–50. doi: 10.1038/nn.3435, 2013.

BRAUN-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M. L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 314–321. doi: 10.1590/S1415-47572007000300003, 2007.

- BRENNER, S.; WOLF, R. Possible nutritional factors in induced pemphigus. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, v. 189, n. 4, p. 337–339, 1994.
- BUCKLEY, S. A.; WALTER, R. B. Update on antigen-specific immunotherapy of acute myeloid leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 10, n. 2, p. 65–75. doi: 10.1007/s11899-015-0250-9, 2015.
- BURGE, S. M.; MARSHALL, J. M.; CEDERHOLM-WILLIAMS, S. A. Plasminogen binding sites in normal human skin. **The British Journal of Dermatology**, v. 126, n. 1, p. 35–41, 1992.
- CALDELARI, R.; DE BRUIN, A.; BAUMANN, D.; et al. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. **The Journal of Cell Biology**, v. 153, n. 4, p. 823–834, 2001.
- CALKINS, C. C.; SETZER, S. V.; JENNINGS, J. M.; et al. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 11, p. 7623–7634. doi: 10.1074/jbc.M512447200, 2006.
- CAPRONI, M.; GIOMI, B.; CARDINALI, C.; et al. Further Support for a Role for Th2-like Cytokines in Blister Formation of Pemphigus. **Clinical Immunology**, v. 98, n. 2, p. 264–271. doi: 10.1006/clim.2000.4974, 2001.
- CASTRO, R. M.; PROENÇA, N. G. [Similarities and differences between Brazilian wild fire and pemphigus foliaceus Cazenave]. **Der Hautarzt; Zeitschrift Für Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete**, v. 33, n. 11, p. 574–577, 1982.
- CHERNYAVSKY, A. I.; ARREDONDO, J.; KITAJIMA, Y.; SATO-NAGAI, M.; GRANDO, S. A. Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis: characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13804–13812. doi: 10.1074/jbc.M611365200, 2007.
- CHIAPA-LABASTIDA, M.; ZENTELLA-DEHESA, A.; LEÓN-DORANTES, G.; BECKER, I. Pemphigus vulgaris: accumulation of apoptotic cells in dermis and epidermis possibly relates to pathophysiology through TNF-alpha production by phagocytes. **European journal of dermatology: EJD**, v. 21, n. 6, p. 874–888. doi: 10.1684/ejd.2011.1508, 2011.
- CIPOLLA, G. A. **Análise de expressão de microRNA candidatos à regulação da resposta imune adaptativa em pênfigo foliáceo**. Dissertation, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2012.
- CIRILLO, N.; GOMBOS, F.; LANZA, A. Changes in desmoglein 1 expression and subcellular localization in cultured keratinocytes subjected to anti-desmoglein 1 pemphigus autoimmunity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 210, n. 2, p. 411–416. doi: 10.1002/jcp.20856, 2007.

COLOMBO, B. M.; CANEVALI, P.; MAGNANI, O.; et al. Defective Expression and Function of the Leukocyte Associated Ig-like Receptor 1 in B Lymphocytes from Systemic Lupus Erythematosus Patients. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2. doi: 10.1371/journal.pone.0031903, 2012.

COWAN, A. J.; LASZLO, G. S.; ESTEY, E. H.; WALTER, R. B. Antibody-based therapy of acute myeloid leukemia with gemtuzumab ozogamicin. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 18, p. 1311–1334, 2013.

CROCKER, P. R.; MCMILLAN, S. J.; RICHARDS, H. E. CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1253, p. 102–111. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06449.x, 2012.

CROCKER, P. R.; MCMILLAN, S. J.; RICHARDS, H. E. CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses: CD33-related siglecs and inflammatory responses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1253, n. 1, p. 102–111. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06449.x, 2012.

CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C.; VARKI, A. Siglecs and their roles in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 4, p. 255–266. doi: 10.1038/nri2056, 2007.

CRUZ, P. H. **Susceptibilidade ao pêfingo foliáceo e o polimorfismo de genes localizados nos cromossomos 12 e 19**. Undergraduate thesis, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2013.

CULTON, D. A.; QIAN, Y.; LI, N.; et al. Advances in Pemphigus and its Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) Phenotype: A Paradigm of Human Autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 31, n. 4, p. 311–324. doi: 10.1016/j.jaut.2008.08.003, 2008.

CUNHA, P. R.; BARRAVIERA, S. R. C. S. Autoimmune bullous dermatoses. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 2, p. 111–124. doi: 10.1590/S0365-05962009000200003, 2009.

DELVA, E.; TUCKER, D. K.; KOWALCZYK, A. P. The desmosome. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, p. a002543. doi: 10.1101/cshperspect.a002543, 2009.

DIAZ, L. A.; ARTEAGA, L. A.; HILARIO-VARGAS, J.; et al. Anti-desmoglein-1 antibodies in onchocerciasis, leishmaniasis and Chagas disease suggest a possible etiological link to Fogo selvagem. **Journal of investigative dermatology**, v. 123, n. 6, p. 1045–1051, 2004.

DIAZ, L. A.; MARCELO, C. L. Pemphigoid and pemphigus antigens in cultured epidermal cells. **British Journal of Dermatology**, v. 98, n. 6, p. 631–637. doi: 10.1111/j.1365-2133.1978.tb03581.x, 1978.

DIAZ, L. A.; PRISAYANH, P. S.; DASHER, D. A.; et al. The IgM Anti-Desmoglein 1 Response Distinguishes Brazilian Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) from

Other Forms of Pemphigus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 3, p. 667–675. doi: 10.1038/sj.jid.5701121, 2008.

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; et al. Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and Historic Epidemiologic Studies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, n. 1, p. 4–12. doi: 10.1111/1523-1747.ep13070394, 1989.

DOMINGUEZ-VILLAR, M.; BAECHER-ALLAN, C. M.; HAFLER, D. A. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. **Nature Medicine**, v. 17, n. 6, p. 673–675. doi: 10.1038/nm.2389, 2011.

DONG, J.; LI, J.; LIU, S.-M.; et al. CD33+/p-STAT1+ double-positive cell as a prognostic factor for stage IIIa gastric cancer. **Medical Oncology**, v. 30, n. 1, p. 1–9. doi: 10.1007/s12032-012-0442-2, 2013.

DUHEN, T.; DUHEN, R.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F.; CAMPBELL, D. J. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. **Blood**, v. 119, n. 19, p. 4430–4440. doi: 10.1182/blood-2011-11-392324, 2012.

DWORZAK, M. N.; FRITSCH, G.; FRÖSCHL, G.; PRINTZ, D.; GADNER, H. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3203–3209, 1998.

EATON, D. P.; DIAZ, L. A.; HANS-FILHO, G.; et al. Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 120–131, 1998.

EKŞIOĞLU-DEMIRALP, E.; KIBAROĞLU, A.; DİRESKENELİ, H.; et al. Phenotypic characteristics of B cells in Behçet's disease: increased activity in B cell subsets. **The Journal of rheumatology**, v. 26, n. 4, p. 826–832, 1999.

FANCIULLI, M.; NORSWORTHY, P. J.; PETRETTO, E.; et al. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 721–723. doi: 10.1038/ng2046, 2007.

FELICIANI, C.; TOTO, P.; AMERIO, P. In vitro C3 mRNA expression in Pemphigus vulgaris: complement activation is increased by IL-1alpha and TNF-alpha. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 3, n. 3, p. 140–144, 1999.

FELICIANI, C.; TOTO, P.; AMERIO, P.; et al. In Vitro and In Vivo Expression of Interleukin-1 $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  mRNA in Pemphigus Vulgaris: Interleukin-1 $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  are Involved in Acantholysis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 1, p. 71–77. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00835.x, 2000.

FERLAZZO, G.; SPAGGIARI, G. M.; SEMINO, C.; MELIOLI, G.; MORETTA, L. Engagement of CD33 surface molecules prevents the generation of dendritic cells from both monocytes and CD34+ myeloid precursors. **European journal of immunology**, v. 30, n. 3, p. 827–833. doi: 10.1002/1521-4141(200003)30:3<827::AID-IMMU827>3.0.CO;2-1, 2000.

FERLAZZO, G.; SPAGGIARI, G. M.; SEMINO, C.; MELIOLI, G.; MORETTA, L. Engagement of CD33 surface molecules prevents the generation of dendritic cells from both monocytes and CD34+ myeloid precursors. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 3, p. 827–833. doi: 10.1002/1521-4141(200003)30:3<827::AID-IMMU827>3.0.CO;2-1, 2000.

FLORES, G.; CULTON, D. A.; PRISAYANH, P.; et al. IgG autoantibody response against keratinocyte cadherins in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of investigative dermatology**, v. 132, n. 11, p. 2573–80. doi: 10.1038/jid.2012.232, 2012.

FLORIAN, S.; SONNECK, K.; CZERNY, M.; et al. Detection of novel leukocyte differentiation antigens on basophils and mast cells by HLDA8 antibodies. **Allergy**, v. 61, n. 9, p. 1054–1062. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01171.x, 2006.

FRANZKE, C.-W.; BRUCKNER, P.; BRUCKNER-TUDERMAN, L. Collagenous Transmembrane Proteins: Recent Insights into Biology and Pathology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4005–4008. doi: 10.1074/jbc.R400034200, 2005.

FREEMAN, S. D.; KELM, S.; BARBER, E. K.; CROCKER, P. R. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 2005–2012. Retrieved September 17, 2013, , 1995.

FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; ROCHA-ALVAREZ, R.; et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in native Americans from Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 949–956, 1995.

FRUSIĆ-ZLOTKIN, M.; RAICHENBERG, D.; WANG, X.; et al. Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis--possible involvement of the EGF receptor. **Autoimmunity**, v. 39, n. 7, p. 563–575. doi: 10.1080/08916930600971836, 2006.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 3, p. 162–174. doi: 10.1038/nri2506, 2009.

GIOUD, M.; MEGHLAOU, A.; COSTA, O.; MONIER, J. C. Antibodies to native type I and II collagens detected by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Collagen and Related Research**, v. 2, n. 6, p. 557–564, 1982.

GNIADDECKI, R.; JEMEC, G. B.; THOMSEN, B. M.; HANSEN, M. Relationship between keratinocyte adhesion and death: anoikis in acantholytic diseases. **Archives of dermatological research**, v. 290, n. 10, p. 528–532, 1998.

GONG, J.; LIU, C.; LIU, W.; et al. An update of miRNASNP database for better SNP selection by GWAS data, miRNA expression and online tools. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2015. doi: 10.1093/database/bav029, 2015.

GONZALEZ, Y.; HERRERA, M. T.; SOLDEVILA, G.; et al. High glucose concentrations induce TNF- $\alpha$  production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. **BMC immunology**, v. 13, p. 19. doi: 10.1186/1471-2172-13-19, 2012.

GRANDO, S. A. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. **Autoimmunity**, v. 45, n. 1, p. 7–35. doi: 10.3109/08916934.2011.606444, 2012.

GRANDO, S. A.; BYSTRYN, J.-C.; CHERNYAVSKY, A. I.; et al. Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 9, p. 764–770. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00934.x, 2009.

GRANDO SA; GLUKHENKY BT; DRANNIK GN; et al. MEdiators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. **Archives of Dermatology**, v. 125, n. 7, p. 925–930. doi: 10.1001/archderm.1989.01670190059006, 1989.

GREGERSEN, P. K.; AMOS, C. I.; LEE, A. T.; et al. REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. **Nature Genetics**, v. 41, n. 7, p. 820–823. doi: 10.1038/ng.395, 2009.

GRICIUC, A.; SERRANO-POZO, A.; PARRADO, A. R.; et al. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. **Neuron**, v. 78, n. 4, p. 631–43. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.014, 2013.

GRIFFIN, J. D.; LINCH, D.; SABBATH, K.; LARCOM, P.; SCHLOSSMAN, S. F. A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells. **Leukemia Research**, v. 8, n. 4, p. 521–534. doi: 10.1016/0145-2126(84)90001-8, 1984.

GRISAR, J.; HAHN, P.; BROSCH, S.; et al. Phenotypic characteristics of human monocytes undergoing transendothelial migration. **Arthritis Research**, v. 3, n. 2, p. 127–132, 2001.

GUO, L.; DU, Y.; CHANG, S.; ZHANG, K.; WANG, J. rSNPBase: a database for curated regulatory SNPs. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D1033–D1039. doi: 10.1093/nar/gkt1167, 2014.

HAILE, L. A.; VON WASIELEWSKI, R.; GAMREKELASHVILI, J.; et al. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. **Gastroenterology**, v. 135, n. 3, p. 871–881, 881.e1–5. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.032, 2008.

HANDGRETINGER, R.; SCHÄFER, H. J.; BAUR, F.; et al. Expression of an early myelopoietic antigen (CD33) on a subset of human umbilical cord blood-derived natural killer cells. **Immunology Letters**, v. 37, n. 2-3, p. 223–228, 1993.

HANS-FILHO, G.; SANTOS, V. DOS; KATAYAMA, J. H.; et al. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, n. 1, p. 68–75. doi: 10.1111/1523-1747.ep12298213, 1996.

HERNÁNDEZ-CASELLES, T.; MARTÍNEZ-ESPARZA, M.; PÉREZ-OLIVA, A. B.; et al. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. 1, p. 46–58. doi: 10.1189/jlb.0205096, 2006.

HERNANDEZ-CASELLES, T.; MARTINEZ-ESPARZA, M.; PEREZ-OLIVA, A. B.; QUINTANILLA-CECCONI, A. M.; GARCIA-ALONZO, A. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 1, p. 46–58. doi: 10.1189/jlb.0205096, 2005.

HERRMANN, H.; CERNY-REITERER, S.; GLEIXNER, K. V.; et al. CD34(+)/CD38(-) stem cells in chronic myeloid leukemia express Siglec-3 (CD33) and are responsive to the CD33-targeting drug gemtuzumab/ozogamicin. **Haematologica**, v. 97, n. 2, p. 219–26. doi: 10.3324/haematol.2010.035006, 2012.

HEUPEL, W.-M.; ZILLIKENS, D.; DRENCKHAHN, D.; WASCHKE, J. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 181, n. 3, p. 1825–1834, 2008.

HORWITZ, D. A. Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 101. doi: 10.1186/ar2894, 2010.

HOYER, J. D.; GROGG, K. L.; HANSON, C. A.; GAMEZ, J. D.; DOGAN, A. CD33 detection by immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues: a new antibody shows excellent specificity and sensitivity for cells of myelomonocytic lineage. **American journal of clinical pathology**, v. 129, n. 2, p. 316–323. doi: 10.1309/E36008Y2H08Q1AYY, 2008.

IOANNOU, M.; ALISSAFI, T.; LAZARIDIS, I.; et al. Crucial Role of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Regulation of Central Nervous System Autoimmune Disease. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 3, p. 1136–1146. doi: 10.4049/jimmunol.1101816, 2012.

JANSE, I. C.; VAN DER WIER, G.; JONKMAN, M. F.; PAS, H. H.; DIERCKS, G. F. H. No Evidence of Apoptotic Cells in Pemphigus Acantholysis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 7, p. 2039–2041. doi: 10.1038/jid.2014.60, 2014.

JANSEN, C. A.; CRUIJSEN, C. W. A.; DE RUITER, T.; et al. Regulated expression of the inhibitory receptor LAIR-1 on human peripheral T cells during T cell activation and differentiation. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 4, p. 914–924. doi: 10.1002/eji.200636678, 2007.

JILANI, I.; ESTEY, E.; HUH, Y.; et al. Differences in CD33 Intensity Between Various Myeloid Neoplasms. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 118, n. 4, p. 560–566. Retrieved September 18, 2013, , 2002.

JOLY, P.; LITROWSKI, N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). **Clinics in dermatology**, v. 29, n. 4, p. 432–6. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.013, 2011.

JONES, C. C.; HAMILTON, R. G.; JORDON, R. E. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. **Journal of Clinical Immunology**, v. 8, n. 1, p. 43–49. doi: 10.1007/BF00915155, 1988.

VAN JOOST, T.; CORMANE, R. H.; PONDMAN, K. W. Direct Immunofluorescent Study of the Skin on Occurrence of Complement in Pemphigus. **British Journal of Dermatology**, v. 87, n. 5, p. 466–474. doi: 10.1111/j.1365-2133.1972.tb01595.x, 1972.

JORDON, R. E. Complement Activation in Pemphigus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 357–358. doi: 10.1111/1523-1747.ep12543739, 1980.

JURCIC, J. G. What Happened to Anti-CD33 Therapy for Acute Myeloid Leukemia? **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 7, n. 1, p. 65–73. doi: 10.1007/s11899-011-0103-0, 2012.

KALANTARI-DEHAGHI, M.; ANHALT, G. J.; CAMILLERI, M. J.; et al. Pemphigus Vulgaris Autoantibody Profiling by Proteomic Technique. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e57587. doi: 10.1371/journal.pone.0057587, 2013.

KALANTARI-DEHAGHI, M.; MOLINA, D. M.; FARHADIEH, M.; et al. New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology. **Experimental dermatology**, v. 20, n. 2, p. 154–156. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01193.x, 2011.

KANG, X.; LU, Z.; CUI, C.; et al. The ITIM-containing receptor LAIR1 is essential for acute myeloid leukaemia development. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 5, p. 665–677. doi: 10.1038/ncb3158, 2015.

KARCH, C. M.; JENG, A. T.; NOWOTNY, P.; et al. Expression of Novel Alzheimer's Disease Risk Genes in Control and Alzheimer's Disease Brains. (S. D. Ginsberg, Ed.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50976. doi: 10.1371/journal.pone.0050976, 2012.



KASAHARA, T.; MUKAIDA, N.; YAMASHITA, K.; et al. IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. **Immunology**, v. 74, n. 1, p. 60–67, 1991.

KATSIARI, C. G.; LIOSSIS, S.-N. C.; SFIKAKIS, P. P. The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 6, p. 491–503. doi: 10.1016/j.semarthrit.2008.11.002, 2010.

KAY, J.; CALABRESE, L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 43 Suppl 3, p. iii2–iii9. doi: 10.1093/rheumatology/keh201, 2004.

KERR, E. C.; RAVENEY, B. J. E.; COPLAND, D. A.; DICK, A. D.; NICHOLSON, L. B. Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations. **Journal of Autoimmunity**, v. 31, n. 4, p. 354–361. doi: 10.1016/j.jaut.2008.08.006, 2008.

KOCH, M. A.; TUCKER-HEARD, G.; PERDUE, N. R.; et al. T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type-1 inflammation. **Nature immunology**, v. 10, n. 6, p. 595–602. doi: 10.1038/ni.1731, 2009.

KOHLER, K. F.; PETZL-ERLER, M. L. No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, n. 2, p. 141–144. doi: 10.1111/j.1744-313X.2006.00585.x, 2006.

KOMATSU, N.; MARIOTTI-FERRANDIZ, M. E.; WANG, Y.; et al. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1903–1908. doi: 10.1073/pnas.0811556106, 2009.

KRAUTH, M.-T.; BÖHM, A.; AGIS, H.; et al. Effects of the CD33-targeted drug gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) on growth and mediator secretion in human mast cells and blood basophils. **Experimental hematology**, v. 35, n. 1, p. 108–116. doi: 10.1016/j.exphem.2006.09.008, 2007.

KURZEN, H.; BRENNER, S. Significance of autoimmunity to non-desmoglein targets in pemphigus. **Autoimmunity**, v. 39, n. 7, p. 549–556. doi: 10.1080/08916930600971554, 2006.

LAJAUNIAS, F.; DAYER, J.-M.; CHIZZOLINI, C. Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. **European journal of immunology**, v. 35, n. 1, p. 243–251. doi: 10.1002/eji.200425273, 2005.

LARSEN, C. G.; ZACHARIAE, C. O. C.; OPPENHEIM, J. J.; MATSUSHIMA, K. Production of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by human dermal fibroblasts in response to interleukin 1 or tumor necrosis factor. **Biochemical and**

**Biophysical Research Communications**, v. 160, n. 3, p. 1403–1408. doi: 10.1016/S0006-291X(89)80160-3, 1989.

LEBBINK, R. J.; VAN DEN BERG, M. C. W.; RUITER, T. DE; et al. The Soluble Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor (LAIR)-2 Antagonizes the Collagen/LAIR-1 Inhibitory Immune Interaction. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1662–1669. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1662, 2008.

LEBBINK, R. J.; RUITER, T. DE; ADELMEIJER, J.; et al. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 6, p. 1419–1425. doi: 10.1084/jem.20052554, 2006.

LEBBINK, R. J.; VAN DEN BERG, M. C. W.; DE RUITER, T.; et al. The soluble leukocyte-associated Ig-like receptor (LAIR)-2 antagonizes the collagen/LAIR-1 inhibitory immune interaction. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 3, p. 1662–1669, 2008.

LEE, H. E.; BERKOWITZ, P.; JOLLY, P. S.; et al. Biphasic activation of p38MAPK suggests that apoptosis is a downstream event in pemphigus acantholysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12524–12532. doi: 10.1074/jbc.M808204200, 2009.

LEE, P. H.; SHATKAY, H. F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. D820–824. doi: 10.1093/nar/gkm904, 2008.

LENTING, P. J.; WESTERLAKEN, G. H. A.; DENIS, C. V.; AKKERMAN, J. W.; MEYAARD, L. Efficient Inhibition of Collagen-Induced Platelet Activation and Adhesion by LAIR-2, a Soluble Ig-Like Receptor Family Member. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12174. doi: 10.1371/journal.pone.0012174, 2010.

LI, N.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E. A; DIAZ, L. A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 11, p. 1501–10. doi: 10.1084/jem.20022031, 2003.

LIN, M. S.; FU, C. L.; AOKI, V.; et al. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 2, p. 207–213. doi: 10.1172/JCI8075, 2000.

LI, N.; ZHAO, M.; WANG, J.; LIU, Z.; DIAZ, L. A. Involvement of the Apoptotic Mechanism in Pemphigus Foliaceus Autoimmune Injury of the Skin. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 1, p. 711–717. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.711, 2009.

LIU, C.-Y.; WANG, Y.-M.; WANG, C.-L.; et al. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 136, n. 1, p. 35–45. doi: 10.1007/s00432-009-0634-0, 2010.

LIU, C.; ZHANG, F.; LI, T.; et al. MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. **BMC genomics**, v. 13, p. 661. doi: 10.1186/1471-2164-13-661, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262, 2001.

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A.; et al. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). “The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research.” **The Journal of investigative dermatology**, v. 98, n. 6, p. 847–850, 1992.

LÓPEZ-ROBLES, E.; AVALOS-DÍAZ, E.; VEGA-MEMIJE, E.; et al. TNF $\alpha$  and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. **International Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 185–188. doi: 10.1046/j.1365-4362.2001.01083.x, 2001.

MAASHO, K.; MASILAMANI, M.; VALAS, R.; et al. The inhibitory leukocyte-associated Ig-like receptor-1 (LAIR-1) is expressed at high levels by human naive T cells and inhibits TCR mediated activation. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 12, p. 1521–1530. doi: 10.1016/j.molimm.2005.01.004, 2005.

MACAULEY, M. S.; CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 653–666. doi: 10.1038/nri3737, 2014.

MACDONALD, K. G.; DAWSON, N. A. J.; HUANG, Q.; et al. Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 4, p. 946–955.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1932, 2015.

MACKAY, M.; STANEVSKY, A.; WANG, T.; et al. Selective dysregulation of the Fc $\gamma$ RIIB receptor on memory B cells in SLE. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 9, p. 2157–2164. doi: 10.1084/jem.20051503, 2006.

MALHEIROS, D.; PANEPUCCI, R. A.; ROSELINO, A. M.; et al. Genome-wide gene expression profiling reveals unsuspected molecular alterations in pemphigus foliaceus. **Immunology**, v. 143, n. 3, p. 381–395. doi: 10.1111/imm.12315, 2014.

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 6, p. 547–558. doi: 10.1038/gene.2009.36, 2009.

MALIK, M.; SIMPSON, J. F.; PARIKH, I.; et al. CD33 Alzheimer’s Risk-Altering Polymorphism, CD33 Expression, and Exon 2 Splicing. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 33, p. 13320–13325. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1224-13.2013, 2013.

MARTEL, P.; JOLY, P. Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. **Clinics in dermatology**, v. 19, n. 6, p. 662–674, 2001.

MARTIN, A. M.; KULSKI, J. K.; WITT, C.; PONTAROTTI, P.; CHRISTIANSEN, F. T. Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 2, p. 81–88. doi: 10.1016/S1471-4906(01)02155-X, 2002.

MATUTES, E.; RODRIGUEZ, B.; POLLI, N.; et al. Characterization of myeloid leukemias with monoclonal antibodies 3C5 and MY9. **Hematological Oncology**, v. 3, n. 3, p. 179–186. doi: 10.1002/hon.2900030306, 1985.

MCCLYMONT, S. A.; PUTNAM, A. L.; LEE, M. R.; et al. Plasticity of Human Regulatory T Cells in Healthy Subjects and Patients with Type 1 Diabetes. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 3918–3926. doi: 10.4049/jimmunol.1003099, 2011.

MCLAREN, W.; PRITCHARD, B.; RIOS, D.; et al. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. **Bioinformatics**, v. 26, n. 16, p. 2069–2070. doi: 10.1093/bioinformatics/btq330, 2010.

MEYAARD, L. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 799–803. doi: 10.1189/jlb.0907609, 2008.

MEYAARD, L.; ADEMA, G. J.; CHANG, C.; et al. LAIR-1, a Novel Inhibitory Receptor Expressed on Human Mononuclear Leukocytes. **Immunity**, v. 7, n. 2, p. 283–290. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80530-0, 1997.

MEYAARD, L.; HURENKAMP, J.; CLEVERS, H.; LANIER, L. L.; PHILLIPS, J. H. Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor-1 Functions as an Inhibitory Receptor on Cytotoxic T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 10, p. 5800–5804, 1999.

MONSIVÁIS-URENDA, A.; NIÑO-MORENO, P.; ABUD-MENDOZA, C.; et al. Analysis of expression and function of the inhibitory receptor ILT2 (CD85j/LILRB1/LIR-1) in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Journal of Autoimmunity**, v. 29, n. 2-3, p. 97–105. doi: 10.1016/j.jaut.2007.05.003, 2007.

MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; et al. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**, v. 33, n. 5-6, p. 388–91, 1991.

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

- MORAND, E. F. New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. 7, p. 419–426. doi: 10.1111/j.1445-5994.2005.00853.x, 2005.
- MORINI, J. P.; JOMAA, B.; GORGI, Y.; et al. Pemphigus foliaceus in young women. An endemic focus in the Sousse area of Tunisia. **Archives of Dermatology**, v. 129, n. 1, p. 69–73, 1993.
- MORTLAND, L.; ALONZO, T. A.; WALTER, R. B.; et al. Clinical Significance of CD33 Nonsynonymous Single-Nucleotide Polymorphisms in Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia Treated with Gemtuzumab-Ozogamicin-Containing Chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 6, p. 1620–1627. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3115, 2013.
- MUNITZ, A. Inhibitory receptors on myeloid cells: New targets for therapy? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 125, n. 1, p. 128–137. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.10.007, 2010.
- MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway - 8.ed.** Artmed Editora, 2014.
- NAKAMURA, Y.; NOMA, M.; KIDOKORO, M.; et al. Expression of CD33 antigen on normal human activated T lymphocytes [letter]. **Blood**, v. 83, n. 5, p. 1442–1443, 1994.
- NAMAZI, M. R.; FALLAHZADEH, M. K.; SHAGHELANI, H.; KAMALI-SARVESTANI, E. Marked elevation of serum macrophage migration inhibitory factor levels in patients with pemphigus vulgaris. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 2, p. 146–148. doi: 10.1111/j.1365-4632.2009.04238.x, 2010.
- NESTOR, M. S.; COCHRAN, A. J.; AHMED, A. R. Mononuclear cell infiltrates in bullous disease. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 88, n. 2, p. 172–175, 1987.
- NGUYEN, D. H.; BALL, E. D.; VARKI, A. Myeloid precursors and acute myeloid leukemia cells express multiple CD33-related Siglecs. **Experimental hematology**, v. 34, n. 6, p. 728–735. doi: 10.1016/j.exphem.2006.03.003, 2006.
- NICHOLSON, L. B.; RAVENEY, B. J. E.; MUNDER, M. Monocyte dependent regulation of autoimmune inflammation. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 23–29, 2009.
- NISHIFUJI, K.; AMAGAI, M.; KUWANA, M.; IWASAKI, T.; NISHIKAWA, T. Detection of Antigen-Specific B Cells in Patients with Pemphigus Vulgaris by Enzyme-Linked Immunospot Assay: Requirement of T Cell Collaboration for Autoantibody Production. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 1, p. 88–94. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00840.x, 2000.
- NISHIMURA, H.; NOSE, M.; HIAI, H.; MINATO, N.; HONJO, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. **Immunity**, v. 11, n. 2, p. 141–151, 1999.

NOVAK, H. **CD33 as Target for Immunotherapy: Functional Properties and Targeting of Cytotoxic T Cells**. PhD thesis, Tel-Aviv: Technion - Israel Institute of Technology, 2008.

O'KEEFE, T. L.; WILLIAMS, G. T.; BATISTA, F. D.; NEUBERGER, M. S. Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 8, p. 1307–1313, 1999.

OLDE NORDKAMP, M. J. M.; BOROSS, P.; YILDIZ, C.; et al. Inhibition of the classical and lectin pathway of the complement system by recombinant LAIR-2. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 3, p. 284–292. doi: 10.1159/000354976, 2014.

OLDE NORDKAMP, M. J. M.; VAN ROON, J. A. G.; DOUWES, M.; et al. Enhanced secretion of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2 (LAIR-2) and soluble LAIR-1 in rheumatoid arthritis: LAIR-2 is a more efficient antagonist of the LAIR-1-collagen inhibitory interaction than is soluble LAIR-1. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 12, p. 3749–3757. doi: 10.1002/art.30612, 2011.

ORR, S. J.; MORGAN, N. M.; ELLIOTT, J.; et al. CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1061–1068. doi: 10.1182/blood-2006-05-023556, 2007.

O'TOOLE, E. A.; MAK, L. L.; GUITART, J.; et al. Induction of keratinocyte IL-8 expression and secretion by IgG autoantibodies as a novel mechanism of epidermal neutrophil recruitment in a pemphigus variant. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 119, n. 1, p. 217–224, 2000.

PATEL, H. P.; DIAZ, L. A.; ANHALT, G. J.; LABIB, R. S.; TAKAHASHI, Y. Demonstration of pemphigus antibodies on the cell surface of murine epidermal cell monolayers and their internalization. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 83, n. 6, p. 409–415, 1984.

PAUL, S. P.; TAYLOR, L. S.; STANSBURY, E. K.; MCVICAR, D. W. Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. **Blood**, v. 96, n. 2, p. 483–490, 2000.

PAUS, R.; AMAGAI, M.; AHMED, A. R.; et al. Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just “witnesses of disease”? **Experimental Dermatology**, v. 15, n. 10, p. 815–815. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00499\_1.x, 2006.

PAVONI, D. P.; CERQUEIRA, L. B.; ROXO, V. M. M. S.; PETZL-ERLER, M. L. Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]**, v. 39, n. 9, p. 1227–1232, 2006.

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

HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 2, p. 110–116. doi: 10.1038/sj.gene.6363939, 2003.

PEIPER, S. C.; ASHMUN, R. A.; LOOK, A. T. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human gene encoding the CD33 myeloid differentiation antigen. **Blood**, v. 72, n. 1, p. 314–321, 1988.

PEREIRA, N. F.; HANSEN, J. A.; LIN, M.-T.; et al. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, n. 6, p. 233–241. doi: 10.1016/j.cyto.2004.08.006, 2004.

PÉREZ-OLIVA, A. B.; MARTÍNEZ-ESPARZA, M.; VICENTE-FERNÁNDEZ, J. J.; et al. Epitope mapping, expression and post-translational modifications of two isoforms of CD33 (CD33M and CD33m) on lymphoid and myeloid human cells. **Glycobiology**, v. 21, n. 6, p. 757–70. doi: 10.1093/glycob/cwq220, 2011.

PETZL-ERLER, M. L.; MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? **Journal of Autoimmunity**, v. 25, n. 2, p. 121–125. doi: 10.1016/j.jaut.2005.08.001, 2005.

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

PIOVEZAN, B. Z.; PETZL-ERLER, M. L. Both qualitative and quantitative genetic variation of MHC class II molecules may influence susceptibility to autoimmune diseases: The case of endemic pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 74, n. 9, p. 1134–1140. doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.008, 2013.

POGGI, A.; PELLA, N.; MORELLI, L.; et al. p40, a novel surface molecule involved in the regulation of the non-major histocompatibility complex-restricted cytolytic activity in humans. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 2, p. 369–376. doi: 10.1002/eji.1830250210, 1995.

POGGI, A.; PELLEGATTA, F.; LEONE, B. E.; MORETTA, L.; ZOCCHI, M. R. Engagement of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 induces programmed cell death and prevents NF- $\kappa$ B nuclear translocation in human myeloid leukemias. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 10, p. 2751–2758. doi: 10.1002/1521-4141(200010)30:10<2751::AID-IMMU2751>3.0.CO;2-L, 2000.

POGGI, A.; TOMASELLO, E.; FERRERO, E.; ZOCCHI, M. R.; MORETTA, L. p40/LAIR-1 regulates the differentiation of peripheral blood precursors to dendritic cells induced by granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 7, p. 2086–2091. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2086::AID-IMMU2086>3.0.CO;2-T, 1998.

POGGI, A.; TOMASELLO, E.; REVELLO, V.; et al. p40 molecule regulates NK cell activation mediated by NK receptors for HLA class I antigens and TCR-mediated triggering of T lymphocytes. **International Immunology**, v. 9, n. 9, p. 1271–1279. doi: 10.1093/intimm/9.9.1271, 1997.

POLLARD, J. A.; ALONZO, T. A.; LOKEN, M.; et al. Correlation of CD33 expression level with disease characteristics and response to gemtuzumab ozogamicin containing chemotherapy in childhood AML. **Blood**, p. blood-2011-12-398370. doi: 10.1182/blood-2011-12-398370, 2012.

PROBST-KEPPER, M.; GEFFERS, R.; KRÖGER, A.; et al. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 9b, p. 3343–3357. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00782.x, 2009.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575. doi: 10.1086/519795, 2007.

PUVIANI, M.; MARCONI, A.; COZZANI, E.; PINCELLI, C. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 1, p. 164–167, 2003.

QAQISH, B. F.; PRISAYANH, P.; QIAN, Y.; et al. Development of an IgG4-Based Predictor of Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 1, p. 110–118. doi: 10.1038/jid.2008.189, 2009.

QIAN, Y.; JEONG, J. S.; MALDONADO, M.; et al. Cutting Edge: Brazilian Pemphigus Foliaceus Anti-Desmoglein 1 Autoantibodies Cross-React with Sand Fly Salivary LJM11 Antigen. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 1535–1539. doi: 10.4049/jimmunol.1200842, 2012.

QIAN, Y.; PRISAYANH, P.; ANDRACA, E.; et al. IgE, IgM and IgG4 anti-desmoglein 1 autoantibody profile in endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 4, p. 985–987. doi: 10.1038/jid.2010.403, 2011.

RADSTAKE, T.; VAN LENT, P. L. E. M.; PESMAN, G.; et al. High production of proinflammatory and Th1 cytokines by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and down regulation upon FcγR triggering. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 6, p. 696–702. doi: 10.1136/ard.2003.010033, 2004.

RAJ, T.; RYAN, K. J.; REPLOGLE, J. M.; et al. CD33: increased inclusion of exon 2 implicates the Ig V-set domain in Alzheimer's disease susceptibility. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 10, p. 2729–2736. doi: 10.1093/hmg/ddt666, 2014.

ROBLEDO, M. A.; PRADA, S.; JARAMILLO, D.; LEON, W. South American pemphigus foliaceus: study of an epidemic in El Bagre and Nechi, Colombia 1982 to 1986. **The British Journal of Dermatology**, v. 118, n. 6, p. 737–744, 1988.

ROCHA-RODRIGUES, D. B.; PASCHOINI, G.; PEREIRA, S. A. L.; et al. High Levels of Interleukin-1 in Patients with Endemic Pemphigus Foliaceus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 741–743. doi: 10.1128/CDLI.10.5.741-743.2003, 2003.



ROCK, B.; MARTINS, C. R.; THEOFILOPOULOS, A. N.; et al. The Pathogenic Effect of IgG4 Autoantibodies in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 22, p. 1463–1469. doi: 10.1056/NEJM198906013202206, 1989.

RODRIGUES, D. B. R.; PEREIRA, S. A. L.; REIS, M. A. DOS; et al. In situ detection of inflammatory cytokines and apoptosis in pemphigus foliaceus patients. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, n. 1, p. 97–100. doi: 10.1043/1543-2165-133.1.97, 2009.

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

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 132, p. 365–386, 2000.

SANTI, C. G.; SOTTO, M. N. Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 3, p. 446–450. doi: 10.1067/mjd.2001.112344, 2001.

SAVERINO, D.; FABBI, M.; MERLO, A.; et al. Surface density expression of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is directly related to inhibition of human T-cell functions. **Human Immunology**, v. 63, n. 7, p. 534–546. doi: 10.1016/S0198-8859(02)00409-3, 2002.

SCHMIDT, E.; GUTBERLET, J.; SIEGMUND, D.; et al. Apoptosis is not required for acantholysis in pemphigus vulgaris. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 296, n. 1, p. C162–172. doi: 10.1152/ajpcell.00161.2008, 2009.

SCHMIDT, E.; WASCHKE, J. Apoptosis in pemphigus. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 7, p. 533–537. doi: 10.1016/j.autrev.2009.01.011, 2009.

SCHMIDT-WOLF, I. G. H.; GRIMM, B.; LEFTEROVA, P.; et al. Propagation of large numbers of cells of a human mixed-lineage T-lymphoid/myeloid. **British Journal of Haematology**, v. 90, n. 3, p. 512–517. doi: 10.1111/j.1365-2141.1995.tb05577.x, 1995.

SHARMA, P.; MAO, X.; PAYNE, A. S. Beyond steric hindrance: The role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 1, p. 1–14. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.05.005, 2007.

SIMMONS, D.; SEED, B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 8, p. 2797–2800. Retrieved September 14, 2013, , 1988.

- SIMONE, R.; PESCE, G.; ANTOLA, P.; et al. Serum LAIR-2 Is Increased in Autoimmune Thyroid Diseases. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63282. doi: 10.1371/journal.pone.0063282, 2013.
- VAN DER SLIK, A. R.; KOELEMAN, B. P. C.; VERDUIJN, W.; et al. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. **Diabetes**, v. 52, n. 10, p. 2639–2642, 2003.
- SON, M.; DIAMOND, B. C1q-Mediated Repression of Human Monocytes Is Regulated by Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor 1 (LAIR-1). **Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 559–568. doi: 10.2119/molmed.2014.00185, 2015.
- SON, M.; SANTIAGO-SCHWARZ, F.; AL-ABED, Y.; DIAMOND, B. C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 46, p. E3160–E3167. doi: 10.1073/pnas.1212753109, 2012.
- SOUSA, J. X.; DIAZ, L. A.; EATON, D. P.; et al. Profile of Trypanosoma cruzi Reactivity in a Population at High Risk for Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 675–680. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0206, 2012.
- SPERR, W. R.; FLORIAN, S.; HAUSWIRTH, A. W.; VALENT, P. CD33 as a target of therapy in acute myeloid leukemia: current status and future perspectives. **Leukemia & Lymphoma**, v. 46, n. 8, p. 1115–1120. doi: 10.1080/10428190500126075, 2005.
- STAHL, E. A.; RAYCHAUDHURI, S.; REMMERS, E. F.; et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. **Nature Genetics**, v. 42, n. 6, p. 508–514. doi: 10.1038/ng.582, 2010.
- STEEVELS, T. A. M.; MEYAARD, L. Immune inhibitory receptors: Essential regulators of phagocyte function. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 3, p. 575–587. doi: 10.1002/eji.201041179, 2011.
- SUGIYAMA, H.; MATSUE, H.; NAGASAKA, A.; et al. CD4+CD25high Regulatory T Cells Are Markedly Decreased in Blood of Patients with Pemphigus Vulgaris. **Dermatology**, v. 214, n. 3, p. 210–220. doi: 10.1159/000099585, 2007.
- TANG, X.; TIAN, L.; ESTESO, G.; et al. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) deficient mice have an altered immune cell phenotype. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 2, p. 548–558. doi: 10.4049/jimmunol.1102044, 2012.
- TAYLOR, V. C.; BUCKLEY, C. D.; DOUGLAS, M.; et al. The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 17, p. 11505–11512, 1999.

THAVENTHIRAN, T. T Cell Co-inhibitory Receptors-Functions and Signalling Mechanisms. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 01, n. S12. doi: 10.4172/2155-9899.S12-004, 2013.

THILIPAN THAVENTHIRAN, S. S. T cell co-inhibitory receptors - functions and signalling mechanisms. **Journal of clinical and cellular Immunology**, v. S12:004, 2012.

THOMAS, R.; QUINN, C. Functional differentiation of dendritic cells in rheumatoid arthritis: role of CD86 in the synovium. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 156, n. 8, p. 3074–3086, 1996.

VAN LOCHEM, E. G.; VAN DER VELDEN, V. H. J.; WIND, H. K.; et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 60B, n. 1, p. 1–13. doi: 10.1002/cyto.b.20008, 2004.

VERBRUGGE, A.; RIJKERS, E. S. K.; RUITER, T. DE; MEYAARD, L. Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 has SH2 domain-containing phosphatase-independent function and recruits C-terminal Src kinase. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 190–198. doi: 10.1002/eji.200535226, 2006a.

VERBRUGGE, A.; RUITER, T. DE; GEEST, C.; COFFER, P. J.; MEYAARD, L. Differential expression of leukocyte-associated Ig-like receptor-1 during neutrophil differentiation and activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 4, p. 828–836. doi: 10.1189/jlb.0705370, 2006b.

VERBRUGGE, A.; RUITER TD, T. DE; CLEVERS, H.; MEYAARD, L. Differential contribution of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs of human leukocyte-associated Ig-like receptor-1 to inhibitory function and phosphatase recruitment. **International Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1349–1358, 2003.

VITALE, C.; ROMAGNANI, C.; FALCO, M.; et al. Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 26, p. 15091–15096, 1999.

VOLOSHIN-SELA, T. **Recombinant Human Antibodies with TCR-like Specificity Directed towards MAGE A (Melanoma Antigen Encoding Gene) HLA-A2 Restricted Epitope**. Master's thesis, Tel-Aviv: Technion - Israel Institute of Technology, 2009.

VU, T. N.; LEE, T. X.; NDOYE, A.; et al. The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **Archives of dermatology**, v. 134, n. 8, p. 971–980, 1998.

VAN DER VUURST DE VRIES, A.-R.; CLEVERS, H.; LOGTENBERG, T.; MEYAARD, L. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is

differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 10, p. 3160–3167. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3160::AID-IMMU3160>3.0.CO;2-S, 1999.

WAGTMANN, N.; ROJO, S.; EICHLER, E.; MOHRENWEISER, H.; LONG, E. O. A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors. **Current biology: CB**, v. 7, n. 8, p. 615–618, 1997.

WALTER, R. B.; RADEN, B. W.; ZENG, R.; et al. ITIM-dependent endocytosis of CD33-related Siglecs: role of intracellular domain, tyrosine phosphorylation, and the tyrosine phosphatases, Shp1 and Shp2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 1, p. 200–211. doi: 10.1189/jlb.0607388, 2008.

WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Database issue, p. D930–D934. doi: 10.1093/nar/gkr917, 2012.

WARREN, S. J. P.; ARTEAGA, L. A.; RIVITTI, E. A.; et al. The Role of Subclass Switching in the Pathogenesis of Endemic Pemphigus Foliaceus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 1, p. 1–5. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12017.x, 2003.

WARREN, S. J. P.; LIN, M.-S.; GIUDICE, G. J.; et al. The Prevalence of Antibodies against Desmoglein 1 in Endemic Pemphigus Foliaceus in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 23–30. doi: 10.1056/NEJM200007063430104, 2000.

WASCHKE, J.; BRUGGEMAN, P.; BAUMGARTNER, W.; ZILLIKENS, D.; DRENCKHAHN, D. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1–containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 11, p. 3157–3165. doi: 10.1172/JCI23475, 2005.

WATANABE, N.; GAVRIELI, M.; SEDY, J. R.; et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. **Nature Immunology**, v. 4, n. 7, p. 670–679. doi: 10.1038/ni944, 2003.

WENDE, H.; COLONNA, M.; ZIEGLER, A.; VOLZ, A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. **Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 10, n. 2, p. 154–160, 1999.

WENDE, H.; VOLZ, A.; ZIEGLER, A. Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. **Immunogenetics**, v. 51, n. 8-9, p. 703–713, 2000.

WILKINSON, R.; LYONS, A. B.; ROBERTS, D.; et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-

cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease. **Blood**, v. 100, n. 1, p. 184–193. doi: 10.1182/blood-2002-01-0027, 2002.

XU, M.; ZHAO, R.; ZHAO, Z. J. Identification and Characterization of Leukocyte-associated Ig-like Receptor-1 as a Major Anchor Protein of Tyrosine Phosphatase SHP-1 in Hematopoietic Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 23, p. 17440–17446. doi: 10.1074/jbc.M001313200, 2000.

YANG, L.; ANDERSON, D. E.; KUCHROO, J.; HAFNER, D. A. Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 7, p. 4409–4414, 2008.

YANG, T.-P.; BEAZLEY, C.; MONTGOMERY, S. B.; et al. Genevar: a database and Java application for the analysis and visualization of SNP-gene associations in eQTL studies. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2474–2476. doi: 10.1093/bioinformatics/btq452, 2010.

YIN, B.; MA, G.; YEN, C.-Y.; et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Prevent Type 1 Diabetes in Murine Models. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 10, p. 5828–5834. doi: 10.4049/jimmunol.0903636, 2010.

YOUSEF, G. M.; ORDON, M. H.; FOUSSIAS, G.; DIAMANDIS, E. P. Genomic organization of the siglec gene locus on chromosome 19q13.4 and cloning of two new siglec pseudogenes. **Gene**, v. 286, n. 2, p. 259–270, 2002.

ZEOTI, D. M.; FIGUEIREDO, J. F.; CHIOSSI, M. P.; ROSELINO, A. M. Serum cytokines in patients with Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]**, v. 33, n. 9, p. 1065–1068, 2000.

ZHANG, L.-X.; YE, J.; CHEN, Y.; et al. The effect of CD33 expression on inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease. **Immunological Investigations**, p. 1–10. doi: 10.3109/08820139.2013.806542, 2013b.

ZHANG, Y.; DING, Y.; HUANG, Y.; et al. Expression of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) on osteoclasts and its potential role in rheumatoid arthritis. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 475–481. doi: 10.6061/clinics/2013(04)07, 2013a.

ZHANG, Y.; LV, K.; ZHANG, C. M.; et al. The role of LAIR-1 (CD305) in T cells and monocytes/macrophages in patients with rheumatoid arthritis. **Cellular Immunology**, v. 287, n. 1, p. 46–52. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.12.005, 2014a.

ZHU, B.; BANDO, Y.; XIAO, S.; et al. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 179, n. 8, p. 5228–5237, 2007.

ZINTZARAS, E.; LAU, J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene–disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches.

**Journal of Clinical Epidemiology**, v. 61, n. 7, p. 634–645. doi:  
10.1016/j.jclinepi.2007.12.011, 2008.

ZOCCHI, M. R.; PELLEGATTA, F.; PIERRI, I.; GOBBI, M.; POGGI, A. Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 prevents granulocyte-monocyte colony stimulating factor-dependent proliferation and Akt1/PKB alpha activation in primary acute myeloid leukemia cells. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 12, p. 3667–3675. doi: 10.1002/1521-4141(200112)31:12<3667::AID-IMMU3667>3.0.CO;2-G, 2001.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - TABELAS E FIGURAS DOS RESULTADOS ADICIONAIS

TABELA 1 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPs DE LAIR1.

<i>rs3826753</i>								<i>rs7257187</i>									
		Pacientes		Controles						Pacientes		Controles					
		n	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	n	%	OR	95% IC	p
Total		97	35	78	34,1				Total		139	50,4	113	48,9			
EU	GG	55	32,4	52	34,4				EU	CC	79	46,5	72	47,7			
Afro		46	41,4	28	36,4				Afro		60	55	40	51,9			
Total		140	50,5	119	52	0,95	0,64-1,39	0,8442	Total		113	40,9	101	43,7	0,91	0,63-1,31	0,6414
EU	AG	91	53,5	76	50,3	1,13	0,70-1,84	0,6222	EU	TC	75	44,1	65	43	1,05	0,66-1,67	0,9065
Afro		51	45,9	40	51,9	0,78	0,41-1,45	0,5249	Afro		42	38,5	34	44,2	0,82	0,45-1,51	0,5415
Total		40	14,4	32	14	1,01	0,58-1,75	1	Total		24	8,7	17	7,4	1,15	0,59-2,24	0,7367
EU	AA	24	14,1	23	15,2	0,99	0,49-1,96	1	EU	TT	16	9,4	14	9,3	1,04	0,47-2,28	1
Afro		14	12,6	9	11,7	0,95	0,36-2,47	1	Afro		7	6,4	3	3,9	1,56	0,38-6,38	0,7374
Total		334	60,3	275	60				Total		391	70,8	327	70,8			
EU	G	201	59,1	180	59,6				EU	C	233	68,5	209	69,2			
Afro		143	64,4	96	62,3				Afro		162	74,3	114	74			
Total		220	39,7	183	40	0,99	0,77-1,28	0,9486	Total		161	29,2	135	29,2	1	0,76-1,31	1
EU	A	139	40,9	122	40,4	1,02	0,74-1,40	0,9359	EU	T	107	31,5	93	30,8	1,03	0,74-1,44	0,8648
Afro		79	35,6	58	37,7	0,91	0,60-1,40	0,7439	Afro		56	25,7	40	26	0,99	0,61-1,58	1
Total		237	85,6	197	86	0,96	0,58-1,59	0,8990	Total		252	91,3	214	92,6	0,83	0,44-1,59	0,6264
EU	G+	146	85,9	128	84,8	1,09	0,58-2,03	0,8745	EU	C+	154	90,6	137	90,7	0,98	0,46-2,09	1
Afro		97	87,4	68	88,3	0,92	0,38-2,24	1	Afro		102	93,6	74	96,1	0,59	0,15-2,36	0,5272
Total		180	65	151	65,9	0,96	0,66-1,39	0,8513	Total		137	49,6	118	51,1	0,94	0,67-1,34	0,7892
EU	A+	115	67,6	99	65,6	1,1	0,69-1,75	0,7228	EU	T+	91	53,5	79	52,3	1,05	0,68-1,63	0,9108
Afro		65	58,6	49	63,6	0,81	0,44-1,47	0,5447	Afro		49	45	37	48,1	0,88	0,49-1,59	0,7655
<i>rs74463408</i>								<i>rs3745444</i>									
		Pacientes		Controles						Pacientes		Controles					
		n	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	n	%	OR	95% IC	p
Total		224	80,3	180	78,6				Total		90	32,1	82	35,8			
EU	CC	138	79,8	116	77,9				EU	CC	51	29,5	48	32			
Afro		90	83,3	62	81,6				Afro		39	35,5	32	41,6			
Total		54	19,4	45	19,7	0,96	0,62-1,50	0,9104	Total		125	44,6	99	43,2	1,15	0,77-1,71	0,5417
EU	GC	34	19,7	30	20,1	0,95	0,55-1,65	0,8890	EU	CT	79	45,7	69	46	1,08	0,65-1,79	0,7959
Afro		18	16,7	13	17,1	0,95	0,44-2,09	1	Afro		46	41,8	30	39	1,26	0,65-2,42	0,5087
Total		1	0,4	4	1,7	0,2	0,02-1,81	0,1790	Total		65	23,2	48	21	1,23	0,76-1,99	0,3978
EU	GG	1	0,6	3	2	0,28	0,03-2,73	0,3376	EU	TT	43	24,9	33	22	1,23	0,67-2,24	0,5429
Afro		0	0	1	1,3				Afro		25	22,7	15	19,5	1,37	0,62-3,02	0,5489
Total		502	90	405	88,4				Total		305	54,5	263	57,4			
EU	C	310	89,6	262	87,9				EU	C	181	52,3	165	55			
Afro		198	91,7	137	90,1				Afro		124	56,4	94	61			
Total		56	10	53	11,6	0,85	0,57-1,27	0,4760	Total		255	45,5	195	42,6	1,13	0,88-1,45	0,3746
EU	G	36	10,4	36	12,1	0,85	0,52-1,38	0,5320	EU	T	165	47,7	135	45	1,11	0,82-1,52	0,5271
Afro		18	8,3	15	9,9	0,83	0,40-1,70	0,7115	Afro		96	43,6	60	39	1,21	0,80-1,85	0,3949
Total		278	99,6	225	98,3	4,94	0,55-44,55	0,1800	Total		190	67,9	147	64,2	0,88	0,58-1,34	0,5924
EU	C+	172	99,4	146	98	3,53	0,36-34,36	0,3394	EU	T+	122	70,5	102	68	0,85	0,51-1,43	0,5997
Afro		108	100	75	98,7	4,31	0,17-107,3	0,4130	Afro		71	64,5	45	58,4	0,82	0,40-1,69	0,7175
Total		55	19,7	49	21,4	0,9	0,59-1,39	0,6596	Total		215	76,8	181	79	1,18	0,81-1,70	0,3978
EU	G+	35	20,2	33	22,1	0,89	0,52-1,52	0,6837	EU	C+	130	75,1	117	78	1,13	0,70-1,81	0,6307
Afro		18	16,7	14	18,4	0,89	0,41-1,91	0,8440	Afro		85	77,3	62	80,5	1,3	0,71-2,40	0,4452

continua

TABELA 1 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPs DE LAIR1.

conclusão

<i>rs56802430</i>								<i>rs11084332</i>							
	Pacientes		Controles		OR	95% IC	P		Pacientes		Controles		OR	95% IC	p
	n	%	n	%					n	%	n	%			
Total	189	70,5	165	78,2				Total	153	57,1	99	43,2			
EU AA	131	79,9	121	86,4				EU TT	88	53,3	58	38,4			
Afro	63	58,9	42	61,8				Afro	63	60,6	38	50			
Total	69	25,7	43	20,4	1,4	0,91-2,16	0,1561	Total	93	34,7	105	45,9	0,57	0,39-0,84	<b>0,0042</b>
EU GA	31	18,9	17	12,1	1,68	0,89-3,20	0,1167	EU CT	62	37,6	73	48,3	0,56	0,35-0,89	<b>0,0171</b>
Afro	36	33,6	25	36,8	0,96	0,50-1,83	1	Afro	33	31,7	32	42,1	0,62	0,33-1,17	0,1505
Total	10	3,7	3	1,4	2,91	0,79-10,76	0,1543	Total	22	8,2	25	10,9	0,57	0,30-1,07	0,0790
EU GG	2	1,2	2	1,4	0,92	0,13-6,66	1	EU CC	15	9,1	20	13,2	0,49	0,23-1,04	0,0864
Afro	8	7,5	1	1,5	5,33	0,64-44,24	0,1499	Afro	8	7,7	6	7,9	0,8	0,26-2,50	0,7728
Total	447	83,4	373	88,4				Total	399	74,4	303	66,2			
EU A	293	89,3	259	92,5				EU T	238	72,1	189	62,6			
Afro	162	75,7	109	80,1				Afro	159	76,4	108	71,1			
Total	89	16,6	49	11,6	1,52	1,04-2,21	<b>0,0329</b>	Total	137	25,6	155	33,8	0,67	0,51-0,88	<b>0,0052</b>
EU G	35	10,7	21	7,5	1,47	0,84-2,60	0,2060	EU C	92	27,9	113	37,4	0,65	0,46-0,90	<b>0,0109</b>
Afro	52	24,3	27	19,9	1,3	0,77-2,19	0,3606	Afro	49	23,6	44	28,9	0,76	0,40-1,22	0,2734
Total	258	96,3	208	98,6	0,37	0,10-1,37	0,1601	Total	246	91,8	204	89,1	1,37	0,75-2,50	0,3567
EU A +	162	98,8	138	98,6	1,17	0,16-8,45	1	EU T +	150	90,9	131	86,8	1,53	0,75-3,10	0,2830
Afro	99	92,5	67	98,5	0,18	0,02-1,51	0,1564	Afro	96	92,3	70	92,1	1,03	0,34-3,10	1
Total	79	29,5	46	21,8	1,5	0,99-2,28	<b>0,0601</b>	Total	115	42,9	130	56,8	0,57	0,40-0,82	<b>0,0022</b>
EU G +	33	20,1	19	13,6	1,6	0,86-2,97	0,1688	EU C +	77	46,7	93	61,6	0,55	0,35-0,85	<b>0,0094</b>
Afro	44	41,1	26	38,2	1,13	0,61-2,10	0,7530	Afro	41	39,4	38	50	0,65	0,36-1,18	0,1734

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; p = VALOR DE p. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE p FIXADO EM 0.05.



TABELA 2 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPs DE LAIR2.

rs2042287								rs2287828									
		Pacientes		Controles						Pacientes		Controles					
		N	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	N	%	OR	95% IC	p
Total		197	71,4	163	72,8				Total		218	78,4	200	87,3			
EU	GG	114	67,5	108	73,5				EU	CC	139	81,3	132	88			
Afro		90	81,1	57	75				Afro		88	80,7	65	86,7			
Total		72	26,1	55	24,6	1,08	0,72-1,62	0,7558	Total		54	19,4	26	11,4	1,91	1,15-3,16	<b>0,0139</b>
EU	AG	50	29,6	35	23,8	1,35	0,82-2,25	0,2525	EU	CT	28	16,4	16	10,7	1,66	0,86-3,21	0,1445
Afro		19	17,1	17	22,4	0,71	0,34-1,47	0,4488	Afro		21	19,3	10	13,3	1,55	0,68-3,52	0,3226
Total		7	2,5	6	2,7	0,97	0,32-2,93	1	Total		6	2,2	3	1,3	1,84	0,45-7,44	0,5080
EU	AA	5	3	4	2,7	1,18	0,31-4,53	1	EU	TT	4	2,3	2	1,3	1,9	0,34-10,55	0,6851
Afro		2	1,8	2	2,6	0,63	0,09-4,63	0,6440	Afro		0	0	0	0			
Total		466	84,4	381	85				Total		490	88,1	426	93			
EU	G	278	82,2	251	85,4				EU	C	306	89,5	280	93,3			
Afro		199	89,6	131	86,2				Afro		197	90,4	140	93,3			
Total		86	15,6	67	15	1,05	0,74-1,49	0,7919	Total		66	11,9	32	7	1,79	1,15-2,80	<b>0,0101</b>
EU	A	60	17,8	43	14,6	1,26	0,82-1,93	0,3314	EU	T	36	10,5	20	6,7	1,65	0,93-2,91	0,0932
Afro		23	10,4	21	13,8	0,72	0,38-1,36	0,3298	Afro		21	9,6	10	6,7	1,49	0,68-3,27	0,3458
Total		269	97,5	218	97,3	1,06	0,35-3,19	1	Total		272	97,8	226	98,7	0,6	0,15-2,43	0,5224
EU	G+	164	97	143	97,3	0,92	0,24-3,48	1	EU	C+	167	97,7	148	98,7	0,56	0,10-3,13	0,6886
Afro		109	98,2	74	97,4	1,47	0,20-10,70	1	Afro		109	100	75	100	1,45	0,03-73,97	1
Total		79	28,6	61	27,2	1,07	0,72-1,59	0,7643	Total		60	21,6	29	12,7	1,9	1,17-3,08	<b>0,0097</b>
EU	A+	55	32,5	39	26,5	1,34	0,82-2,18	0,2680	EU	T+	32	18,7	18	12	1,69	0,90-3,15	0,1227
Afro		21	18,9	19	25	0,7	0,35-1,42	0,3656	Afro		21	19,3	10	13,3	1,55	0,68-3,52	0,3226
rs73070113								rs61737751									
		Pacientes		Controles						Pacientes		Controles					
		n	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	N	%	OR	95% IC	p
Total		229	82,4	199	86,5				Total		255	92,1	213	93			
EU	AA	142	82,6	129	85,4				EU	CC	154	90,1	139	92,7			
Afro		86	78,9	69	89,6				Afro		100	92,6	70	93,3			
Total		48	17,3	29	12,6	1,44	0,88-2,37	0,1718	Total		22	7,9	16	7	1,15	0,59-2,24	0,7368
EU	AT	29	16,9	20	13,2	1,32	0,71-2,44	0,4377	EU	CT	17	9,9	11	7,3	1,4	0,63-3,08	0,4351
Afro		23	21,1	8	10,4	2,31	0,97-5,48	0,0715	Afro		8	7,4	5	6,7	1,12	0,35-3,57	1
Total		1	0,4	2	0,9				Total		0	0	0	0			
EU	TT	1	0,6	2	1,3				EU	TT	0	0	0	0			
Afro		0	0	0	0				Afro		0	0	0	0			
Total		506	91	427	92,8				Total		532	96	442	96,5			
EU	A	313	91	278	92,1				EU	C	325	95	289	96,3			
Afro		195	89,4	146	94,8				Afro		208	96,3	145	96,7			
Total		50	9	33	7,2	1,28	0,81-2,02	0,3029	Total		22	4	16	3,5	1,14	0,59-2,20	0,7418
EU	T	31	9	24	7,9	1,15	0,66-2,00	0,6732	EU	T	17	5	11	3,7	1,37	0,63-2,98	0,4456
Afro		23	10,6	8	5,2	2,15	0,94-4,95	0,0857	Afro		8	3,7	5	3,3	1,12	0,36-3,48	1
Total		277	99,6	228	99,1	2,43	0,22-26,98	0,5923	Total		277	100	229	100	1,21	0,02-61,23	1
EU	A+	171	99,4	149	98,7	2,3	0,21-25,58	0,6009	EU	C+	171	100	150	100	1,14	0,02-57,84	1
Afro		109	100	77	100	1,41	0,03-72,05	1	Afro		108	100	75	100	1,44	0,03-73,30	1
Total		49	17,6	31	13,5	1,37	0,84-2,24	0,2222	Total		22	7,9	16	7	1,15	0,59-2,24	0,7368
EU	T+	30	17,4	22	14,6	1,24	0,68-2,26	0,5450	EU	T+	17	9,9	11	7,3	1,4	0,63-3,08	0,4351
Afro		23	21,1	8	10,4	2,31	0,97-5,48	0,0715	Afro		8	7,4	5	6,7	1,12	0,35-3,57	1

continua

TABELA 2 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPs DE *LAIR2*.

conclusão

<i>rs34429135</i>								<i>rs2277974</i>									
		Pacientes		Controles						Pacientes		Controles					
		n	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	n	%	OR	95% IC	p
Total		249	89,9	212	92,6				Total		99	35,5	74	32,5			
EU	<i>TT</i>	163	95,3	143	95,3				EU	<i>CC</i>	58	33,7	51	34,2			
Afro		88	80	65	86,7				Afro		46	41,4	22	28,6			
Total		27	9,7	17	7,4	1,35	0,72-2,55	0,4286	Total		135	48,4	105	46,1	0,96	0,65-1,43	0,9199
EU	<i>TA</i>	8	4,7	7	4,7	1	0,35-2,83	1	EU	<i>TC</i>	88	51,2	64	43	1,21	0,74-1,98	0,5275
Afro		20	18,2	10	13,3	1,48	0,65-3,37	0,4195	Afro		44	39,6	40	51,9	0,53	0,27-1,02	0,0685
Total		1	0,4	0	0	2,56	0,10-63,10	1	Total		45	16,1	49	21,5	0,69	0,41-1,14	0,1585
EU	<i>AA</i>	0	0	0	0	0,88	0,02-44,56	1	EU	<i>TT</i>	26	15,1	34	22,8	0,67	0,36-1,27	0,2612
Afro		2	1,8	0	0	3,7	0,17-78,44	0,5098	Afro		21	18,9	15	19,5	0,67	0,29-1,54	0,3926
Total		525	94,8	441	96,3				Total		333	59,7	253	55,5			
EU	<i>T</i>	334	97,7	293	97,7				EU	<i>C</i>	204	59,3	166	55,7			
Afro		196	89,1	140	93,3				Afro		136	61,3	84	54,5			
Total		29	5,2	17	3,7	1,43	0,77-2,64	0,2895	Total		225	40,3	203	44,5	0,84	0,66-1,08	0,1803
EU	<i>A</i>	8	2,3	7	2,3	1	0,36-2,80	1	EU	<i>T</i>	140	40,7	132	44,3	0,86	0,63-1,18	0,3788
Afro		24	10,9	10	6,7	1,71	0,79-3,69	0,2007	Afro		86	38,7	70	45,5	0,76	0,50-1,15	0,203
Total		276	99,6	229	100	0,4	0,02-9,91	1	Total		234	83,9	179	78,5	1,42	0,91-2,23	0,1358
EU	<i>T+</i>	171	100	150	100	1,14	0,02-57,84	1	EU	<i>C+</i>	146	84,9	115	77,2	1,66	0,94-2,93	0,0860
Afro		108	98,2	75	100	0,29	0,01-6,08	0,5153	Afro		90	81,1	62	80,5	1,04	0,50-2,17	1
Total		28	10,1	17	7,4	1,4	0,75-2,63	0,3473	Total		180	64,5	154	67,5	0,87	0,60-1,27	0,5103
EU	<i>A+</i>	8	4,7	7	4,7	1	0,35-2,83	1	EU	<i>T+</i>	114	66,3	98	65,8	1,02	0,64-1,63	1
Afro		22	20	10	13,3	1,63	0,72-3,67	0,3224	Afro		65	58,6	55	71,4	0,57	0,30-1,05	0,0895
<i>rs114834145</i>								<i>rs2277971</i>									
		Pacientes		Controles						Pacientes		Controles					
		n	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	n	%	OR	95% IC	p
Total		225	80,9	191	82,7				Total		143	51,4	119	52			
EU	<i>AA</i>	141	82,5	122	80,3				EU	<i>TT</i>	87	50,9	81	53,6			
Afro		88	79,3	67	87				Afro		57	51,4	39	50,6			
Total		52	18,7	39	16,9	1,13	0,72-1,79	0,6427	Total		110	39,6	92	40,2	1	0,69-1,44	1
EU	<i>GA</i>	29	17	29	19,1	0,87	0,49-1,53	0,6641	EU	<i>CT</i>	68	39,8	60	39,7	1,06	0,67-1,67	0,9065
Afro		23	20,7	10	13	1,75	0,78-3,93	0,2418	Afro		48	43,2	31	40,3	1,06	0,58-1,95	0,8778
Total		1	0,4	1	0,4	0,85	0,05-13,67	1	Total		25	9	18	7,9	1,16	0,60-2,22	0,7418
EU	<i>GG</i>	1	0,6	1	0,7	0,87	0,05-13,99	1	EU	<i>CC</i>	16	9,4	10	6,6	1,49	0,64-3,47	0,4030
Afro		0	0	0	0	0,76	0,01-38,97	1	Afro		6	5,4	7	9,1	0,59	0,18-1,88	0,3861
Total		502	90,3	421	91,1				Total		396	71,2	330	72,1			
EU	<i>A</i>	311	90,9	273	89,8				EU	<i>T</i>	242	70,8	222	73,5			
Afro		199	89,6	144	93,5				Afro		162	73	109	70,8			
Total		54	9,7	41	8,9	1,11	0,72-1,69	0,6666	Total		160	28,8	128	27,9	1,04	0,79-1,37	0,7800
EU	<i>G</i>	31	9,1	31	10,2	0,88	0,52-1,48	0,6886	EU	<i>C</i>	100	29,2	80	26,5	1,15	0,81-1,62	0,4817
Afro		23	10,4	10	6,5	1,66	0,77-3,61	0,2659	Afro		60	27	45	29,2	0,9	0,57-1,42	0,6422
Total		277	99,6	230	99,6	1,2	0,07-19,37	1	Total		253	91	211	92,1	0,86	0,46-1,63	0,7493
EU	<i>A+</i>	170	99,4	151	99,3	1,13	0,07-18,17	1	EU	<i>T+</i>	155	90,6	141	93,4	0,69	0,30-1,56	0,4170
Afro		111	100	77	100	1,44	0,03-73,36	1	Afro		105	94,6	70	90,9	1,75	0,56-5,43	0,3866
Total		53	19,1	40	17,3	1,13	0,71-1,77	0,6460	Total		135	48,6	110	48	1,02	0,72-1,45	0,9290
EU	<i>G+</i>	30	17,5	30	19,7	0,87	0,49-1,52	0,6681	EU	<i>C+</i>	84	49,1	70	46,4	1,12	0,72-1,73	0,6555
Afro		23	20,7	10	13	1,75	0,78-3,93	0,2418	Afro		54	48,6	38	49,4	0,97	0,54-1,74	1

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; *p* = VALOR DE *p*. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE *p* FIXADO EM 0,05.

TABELA 3 - ANÁLISES ESTRATIFICADAS COM INDIVÍDUOS DA AMOSTRA TOTAL PARA OS SNPs DE *LAIR1* ASSOCIADOS COM PF.

<i>rs56802430</i>	<i>rs11084332</i>	Pacientes		Controles		OR	95% IC	<i>p</i>
		n	%	n	%			
<i>G+</i>	<i>C+</i>	18	7	19	9,1	0,42	0,19-0,92	<b>0,0408</b>
<i>G+</i>	<i>T/T</i>	59	23	26	12,4			
<i>A/A</i>	<i>C+</i>	90	35,2	100	47,8	0,65	0,42-0,99	0,0508
<i>A/A</i>	<i>T/T</i>	89	34,8	64	30,6			
<i>G+</i>	<i>C+</i>	18	7	19	9,1	1,05	0,52-2,13	1
<i>A/A</i>	<i>C+</i>	90	35,2	100	47,8			
<i>G+</i>	<i>T/T</i>	59	23	26	12,4	1,63	0,93-2,86	0,0955
<i>A/A</i>	<i>T/T</i>	89	34,8	64	30,6			

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; *p* = VALOR DE *p*. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE *p* FIXADO EM 0.05. AS DUAS PRIMEIRAS COMPARAÇÕES ESTÃO ESTRATIFICADAS SEGUNDO O GENÓTIPO DE *RS56802430*, E A TERCEIRA E QUARTA COMPARAÇÕES ESTÃO ESTRATIFICADAS SEGUNDO O GENÓTIPO DE *RS11084332*. NA PRIMEIRA COMPARAÇÃO, POR EXEMPLO, O NÚMERO DE PORTADORES DE *rs56802430 G+*, *rs11084332 C+* É COMPARADO COM O NÚMERO DE PORTADORES *rs56802430 G+*, *rs11084332 TT* ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

TABELA 4 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÕES E FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS 6 SNPs DE *LAI1* (*rs3826753-rs7257187-rs74463408-rs3745444-rs56802430-rs11084332*) E PELOS SNPs ASSOCIADOS COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE RNAm (*rs3826753-rs74463408-rs3745444-rs56802430*) NA AMOSTRA TOTAL.

		Pacientes				Controles											
		n	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	n	%	OR	95% IC	p
1	<i>ATCTAC</i>	14	2,5	15	3,2	0,77	0,37-1,60	0,5711	1	<i>GCTA</i>	186	33,21	145	31,4	1,09	0,84-1,42	0,5455
2	<i>GCCTAC</i>	51	9,1	48	10,4	0,86	0,57-1,31	0,5245	2	<i>ACCA</i>	114	20,36	90	19,5	1,06	0,78-1,45	0,7532
3	<i>ATGCAC</i>	22	3,9	25	5,4	0,72	0,39-1,29	0,2952	3	<i>GCCA</i>	82	14,64	89	19,3	0,72	0,52-1,00	0,0533
4	<i>ATCCAC</i>	25	4,5	24	5,2	0,85	0,48-1,52	0,6597	4	<i>AGCA</i>	51	91,07	47	10,2	0,89	0,59-1,35	0,5948
5	<i>GCCAC</i>	26	4,6	36	7,8	0,58	0,34-0,97	<b>0,0476</b>	5	<i>ACTA</i>	32	57,14	32	6,93	0,82	0,49-1,36	0,4399
6	<i>GCCTGT</i>	29	5,2	16	3,5	1,53	0,812-2,85	0,2205	6	<i>GCCG</i>	35	6,25	23	4,98	1,28	0,75-2,20	0,4163
7	<i>ACCCGT</i>	11	2	11	2,4	0,82	0,35-1,92	0,6711	7	<i>GCTG</i>	31	55,36	17	3,68	1,54	0,84-2,82	0,1823
8	<i>GCCCGT</i>	32	5,7	17	3,7	1,59	0,87-2,90	0,1426	8	<i>ACCG</i>	17	30,36	10	2,16	1,42	0,64-3,13	0,4370
9	<i>ATCTAT</i>	12	2,1	11	2,4	0,90	0,39-2,06	0,8347									
10	<i>GCCTAT</i>	139	24,8	101	21,8	1,18	0,88-1,58	0,2676									
11	<i>ATGCAT</i>	29	5,2	25	5,4	1,17	0,68-2,04	0,5797									
12	<i>ATCCAT</i>	47	8,4	30	6,5	1,32	0,82-2,13	0,2843									
13	<i>ACCCAT</i>	41	7,3	31	6,7	1,10	0,68-1,79	0,7145									
14	<i>GCCCAT</i>	54	9,6	52	11,2	0,84	0,56-1,26	0,4118									

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; *p* = VALOR DE *p*. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE *p* FIXADO EM 0.05. A LISTA DE HAPLÓTIPOS NÃO INCLUI TODOS OS HAPLÓTIPOS POSSÍVEIS, JÁ QUE ALGUNS DELES SÃO MUITO RAROS PARA SEREM CONSIDERADOS NAS ANÁLISES. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS UTILIZANDO A SOMA DE TODOS OS OUTROS HAPLÓTIPOS COMO REFERÊNCIA.

TABELA 5 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÕES E FREQUÊNCIAS DOS DIPLÓTIPOS FORMADOS PELOS 2 SNPs DE LAIR1 ASSOCIADOS COM PF (*rs56802430-rs11084332*).

	Pacientes		Controles		OR	95% IC	<i>p</i>
	n	%	n	%			
AT	329	58,8	258	55,7	1,13	0,88-1,45	0,3412
AC	139	24,8	150	32,4	0,69	0,53-0,90	<b>0,0080</b>
GT	86	15,4	49	10,6	1,53	1,05-2,23	<b>0,0262</b>
GC	6	1,1	6	1,3	0,82	0,27-2,57	0,7770

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; *p* = VALOR DE *p*. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE *p* FIXADO EM 0.05. A LISTA DE HAPLÓTIPOS NÃO INCLUI TODOS OS HAPLÓTIPOS POSSÍVEIS, JÁ QUE ALGUNS DELES SÃO MUITO RAROS PARA SEREM CONSIDERADOS NAS ANÁLISES. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS UTILIZANDO A SOMA DE TODOS OS OUTROS HAPLÓTIPOS COMO REFERÊNCIA.

TABELA 6 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÕES E FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS 8 SNPs de LAIR2 (*rs2042287-rs2287828-rs73070113-rs61737751-rs34429135-rs2277974-rs114834145-rs2277971*).

		Pacientes		Controles		OR	95% IC	<i>p</i>
		n	%	n	%			
1	ACACTTAT	16	3,1	18	3,9	0,73	0,37-1,45	0,3859
2	GCTCTCAC	8	1,6	6	1,3	1,11	0,38-3,22	1
3	ACACTCAC	27	5,2	15	3,2	1,52	0,80-2,90	0,2093
4	GCACTTAT	174	33,7	161	34,8	0,85	0,66-1,11	0,2548
5	GCACTCAT	42	8,1	43	9,3	0,80	0,51-1,25	0,3629
6	GCACTCAC	81	15,7	87	18,8	0,73	0,53-1,02	0,0749
7	GCACACAT	25	4,8	17	3,7	1,23	0,66-2,31	0,5318
8	ATACTTAT	27	5,2	20	4,3	1,13	0,62-2,04	0,765
9	GCACTCGT	50	9,7	36	7,8	1,17	0,75-1,83	0,5717
10	GCTCTCAT	41	7,9	24	5,2	1,45	0,86-2,44	0,1976
11	ACATTCAC	16	3,1	13	2,8	1,02	0,49-2,15	1
12	GTACTTAT	8	1,6	2	0,4	3,36	0,71-15,90	0,1226
13	GTACTCAC	24	4,7	5	1,1	4,12	1,56-10,88	<b>0,0020</b>

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; *p* = VALOR DE *p*. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE *p* FIXADO EM 0.05. A LISTA DE HAPLÓTIPOS NÃO INCLUI TODOS OS HAPLÓTIPOS POSSÍVEIS, JÁ QUE ALGUNS DELES SÃO MUITO RAROS PARA SEREM CONSIDERADOS NAS ANÁLISES. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS UTILIZANDO A SOMA DE TODOS OS OUTROS HAPLÓTIPOS COMO REFERÊNCIA.

TABELA 7 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÕES E FREQUÊNCIAS DOS DIPLÓTIPOS FORMADOS PELOS 2 SNPs DE LAIR2 ASSOCIADOS COM EXPRESSÃO GÊNICA (*rs73070113-rs2277971*).

	Pacientes		Controles		OR	95% IC	<i>p</i>
	n	%	n	%			
TC	5	0,91	2	0,44	2,08	0,40-10,80	0,4657
AC	153	27,72	126	27,51	1,01	0,76-1,33	1
TT	45	8,15	31	6,77	1,22	0,76-1,97	0,4725
AT	349	63,22	299	65,28	0,91	0,71-1,18	0,5104

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; *p* = VALOR DE *p*. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE *p* FIXADO EM 0.05. A LISTA DE HAPLÓTIPOS NÃO INCLUI TODOS OS HAPLÓTIPOS POSSÍVEIS, JÁ QUE ALGUNS DELES SÃO MUITO RAROS PARA SEREM CONSIDERADOS NAS ANÁLISES. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS UTILIZANDO A SOMA DE TODOS OS OUTROS HAPLÓTIPOS COMO REFERÊNCIA.

TABELA 8 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPs DE CD33.

<i>rs273640</i>								<i>rs3826656</i>							
	Pacientes		Controles		OR	95% IC	<i>p</i>		Pacientes		Controles		OR	95% IC	<i>p</i>
	n	%	n	%					n	%	n	%			
Total	121	44,5	77	34,8				Total	179	65,3	140	62,2			
EU GG	80	47,9	44	30,6				EU AA	102	60,4	91	61,5			
Afro	36	34	27	36,5				Afro	77	73,3	46	62,2			
Total	114	41,9	113	51,1	0,64	0,44-0,95	<b>0,0250</b>	Total	79	28,8	71	31,6	0,87	0,59-1,29	0,4881
EU GT	66	39,5	78	54,2	0,47	0,28-0,76	<b>0,0031</b>	EU AG	56	33,1	46	31,1	1,09	0,67-1,76	0,8063
Afro	52	49,1	37	50	1,05	0,55-2,03	1	Afro	23	21,9	26	35,1	0,53	0,27-1,03	0,0863
Total	37	13,6	31	14	0,76	0,44-1,33	0,3907	Total	16	5,8	14	6,2	0,89	0,42-1,89	0,8482
EU TT	21	12,6	22	15,3	0,53	0,26-1,06	0,0741	EU GG	11	6,5	11	7,4	0,89	0,37-2,16	0,8253
Afro	18	17	10	13,5	1,35	0,54-3,39	0,6450	Afro	5	4,8	2	2,7	1,49	0,28-8,02	1
Total	356	65,4	267	60,4				Total	437	79,7	351	78			
EU G	226	67,7	166	57,6				EU A	260	76,9	228	77			
Afro	124	58,5	91	61,5				Afro	177	84,3	118	79,7			
Total	188	34,6	175	39,6	0,81	0,62-1,05	0,1112	Total	111	20,3	99	22	0,9	0,66-1,22	0,5326
EU T	108	32,3	122	42,4	0,65	0,47-0,90	<b>0,0124</b>	EU G	78	23,1	68	23	1,01	0,69-1,46	1
Afro	88	41,5	57	38,5	1,13	0,74-1,74	0,5866	Afro	33	15,7	30	20,3	0,73	0,42-1,27	0,3239
Total	235	86,4	190	86	1,04	0,62-1,73	0,8963	Total	258	94,2	211	93,8	1,07	0,51-2,24	0,8527
EU G+	146	87,4	122	84,7	1,25	0,66-2,39	0,5137	EU A+	158	93,5	137	92,6	1,15	0,48-2,74	0,8262
Afro	88	83	64	86,5	0,76	0,33-1,77	0,6766	Afro	100	95,2	72	97,3	0,56	0,10-2,95	0,7013
Total	151	55,5	144	65,2	0,67	0,46-0,96	<b>0,0337</b>	Total	95	34,7	85	37,8	0,87	0,61-1,26	0,5122
EU T+	87	52,1	100	69,4	0,48	0,30-0,76	<b>0,0025</b>	EU G+	67	39,6	57	38,5	1,05	0,67-1,65	0,9082
Afro	70	66	47	63,5	1,12	0,60-2,08	0,7526	Afro	28	26,7	28	37,8	0,6	0,32-1,13	0,1408
<i>rs3865444</i>								<i>rs2455069</i>							
	Pacientes		Controles		OR	95% IC	<i>p</i>		Pacientes		Controles		OR	95% IC	<i>p</i>
	n	%	n	%					n	%	n	%			
Total	120	43,2	107	46,3				Total	125	45,1	84	36,4			
EU GG	67	39,2	71	46,7				EU AA	81	47,6	49	32,5			
Afro	55	50,5	37	48,1				Afro	40	36,4	31	40,3			
Total	109	39,2	101	43,7	0,96	0,66-1,40	0,8486	Total	122	44	120	51,9	0,68	0,47-0,99	<b>0,0471</b>
EU GT	74	43,3	64	42,1	1,23	0,76-1,97	0,4701	EU AG	72	42,4	82	54,3	0,53	0,33-0,85	<b>0,0120</b>
Afro	41	37,6	37	48,1	0,75	0,41-1,37	0,3564	Afro	55	50	38	49,4	1,12	0,60-2,10	0,7513
Total	49	17,6	23	10	1,9	1,09-3,33	<b>0,0288</b>	Total	30	10,8	27	11,7	0,75	0,41-1,35	0,3647
EU TT	30	17,5	17	11,2	1,87	0,95-3,70	0,0906	EU GG	17	10	20	13,2	0,51	0,25-1,08	0,0895
Afro	13	11,9	3	3,9	2,92	0,78-10,95	0,1596	Afro	15	13,6	8	10,4	1,45	0,55-3,86	0,4782
Total	349	62,8	315	68,2				Total	372	67,1	288	62,3			
EU G	208	60,8	206	67,8				EU A	234	68,8	180	59,6			
Afro	151	69,3	111	72,1				Afro	135	61,4	100	64,9			
Total	207	37,2	147	31,8	1,27	0,98-1,65	0,0746	Total	182	32,9	174	37,7	0,81	0,63-1,05	0,1134
EU T	134	39,2	98	32,2	1,35	0,98-1,87	0,0710	EU G	106	31,2	122	40,4	0,67	0,48-0,92	<b>0,0166</b>
Afro	67	30,7	43	27,9	1,15	0,73-1,81	0,5668	Afro	85	38,6	54	35,1	1,17	0,76-1,79	0,5151
Total	229	82,4	208	90	0,52	0,30-0,88	<b>0,0151</b>	Total	247	89,2	204	88,3	1,09	0,63-1,89	0,7792
EU G+	141	82,5	135	88,8	0,59	0,31-1,12	0,1159	EU A+	153	90	131	86,8	1,37	0,69-2,73	0,3859
Afro	96	88,1	74	96,1	0,3	0,08-1,09	0,0652	Afro	95	86,4	69	89,6	0,73	0,29-1,83	0,6520
Total	158	56,8	124	53,7	1,14	0,80-1,61	0,5308	Total	152	54,9	147	63,6	0,69	0,49-0,99	<b>0,0470</b>
EU T+	104	60,8	81	53,3	1,36	0,87-2,12	0,1784	EU G+	89	52,4	102	67,5	0,53	0,34-0,83	<b>0,0063</b>
Afro	54	49,5	40	51,9	0,91	0,51-1,63	0,7677	Afro	70	63,6	46	59,7	1,18	0,65-2,15	0,6469

continua

TABELA 8 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPS DE CD33.

<i>rs11882250</i>								<i>rs7256496</i>									
		Pacientes		Controles						Pacientes		Controles					
		n	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	n	%	OR	95% IC	p
Total		265	96,7	215	94,3				Total		258	93,5	211	91,7			
EU	TT	165	97,6	143	94,7				EU	AA	163	95,9	142	95,3			
Afro		102	94,4	70	93,3				Afro		98	89,1	65	84,4			
Total		9	3,3	13	5,7	0,56	0,24-1,34	0,1973	Total		17	6,2	18	7,8	0,77	0,39-1,54	0,4857
EU	TC	4	2,4	8	5,3	0,43	0,13-1,47	0,2393	EU	AG	7	4,1	7	4,7	0,87	0,30-2,54	1
Afro		6	5,6	5	6,7	0,82	0,24-2,80	0,7616	Afro		11	10	11	14,3	0,66	0,27-1,62	0,368
Total		0	0	0	0				Total		1	0,4	1	0,4			
EU	CC	0	0	0	0				EU	GG	0	0	0	0			
Afro		0	0	0	0				Afro		1	0,9	1	1,3			
Total		539	98,4	443	97,1				Total		533	96,6	440	95,7			
EU	T	334	98,8	294	97,4				EU	A	333	97,9	291	97,7			
Afro		210	97,2	145	96,7				Afro		207	94,1	141	91,6			
Total		9	1,6	13	2,9	0,57	0,24-1,34	0,2022	Total		19	3,4	20	4,3	0,78	0,41-1,49	0,5132
EU	C	4	1,2	8	2,6	0,44	0,13-1,48	0,2438	EU	G	7	2,1	7	2,3	0,87	0,30-2,52	1
Afro		6	2,8	5	3,3	0,83	0,25-2,77	0,7648	Afro		13	5,9	13	8,4	0,68	0,31-1,51	0,4098
Total		274	100	228	100	1,2	0,02-60,84	1	Total		275	99,6	229	99,6	1,2	0,07-19,32	1
EU	T+	169	100	151	100	1,12	0,02-56,79	1	EU	A+	170	100	149	100	1,14	0,02-57,89	1
Afro		108	100	75	100	1,44	0,03-73,30	1	Afro		109	99,1	76	98,7	1,43	0,09-23,30	1
Total		9	3,3	13	5,7	0,56	0,24-1,34	0,1973	Total		18	6,5	19	8,3	0,77	0,40-1,51	0,4953
EU	C+	4	2,4	8	5,3	0,43	0,13-1,47	0,2393	EU	G+	7	4,1	7	4,7	0,87	0,29-2,54	1
Afro		6	5,6	5	6,7	0,82	0,24-2,81	0,7616	Afro		12	10,9	12	15,6	0,66	0,28-1,57	0,3796
<i>rs34912427</i>								<i>rs58981829</i>									
		Pacientes		Controles						Pacientes		Controles					
		n	%	n	%	OR	95% IC	p			n	%	n	%	OR	95% IC	p
Total		102	36,8	94	41,2				Total		266	95,7	217	95,2			
EU	DD	57	33,3	65	42,8				EU	GG	168	97,7	145	96			
Afro		46	42,6	30	40				Afro		101	91,8	71	93,4			
Total		123	44,4	105	46,1	1,08	0,74-1,58	0,6976	Total		12	4,3	11	4,8	0,89	0,39-2,06	0,8322
EU	TD	82	48	66	43,4	1,42	0,88-2,29	0,1788	EU	AG	4	2,3	6	4	0,58	0,16-2,08	0,5238
Afro		48	44,4	39	52	0,8	0,43-1,50	0,5275	Afro		9	8,2	5	6,6	1,27	0,41-3,936	0,7826
Total		52	18,8	29	12,7	1,65	0,97-2,82	0,0836	Total		0	0	0	0			
EU	TT	32	18,7	21	13,8	1,74	0,90-3,35	0,1032	EU	AA	0	0	0	0			
Afro		14	13	6	8	1,52	0,53-4,40	0,6046	Afro		0	0	0	0			
Total		327	59	293	64,3				Total		544	97,8	445	97,6			
EU	D	196	57,3	196	64,5				EU	G	340	98,8	296	98			
Afro		140	64,8	99	66				Afro		211	95,9	147	96,7			
Total		227	41	163	35,7	1,25	0,97-1,61	0,0918	Total		12	2,2	11	2,4	0,89	0,39-2,04	0,8341
EU	T	146	42,7	108	35,5	1,35	0,98-1,89	<b>0,0641</b>	EU	A	4	1,2	6	2	0,58	0,16-2,08	0,5271
Afro		76	35,2	51	34	1,05	0,68-1,63	0,8244	Afro		9	4,1	5	3,3	1,25	0,41-3,82	0,7869
Total		225	81,2	199	87,3	0,63	0,39-1,03	0,0686	Total		278	100	228	100	1,22	0,02-61,72	1
EU	D+	139	81,3	131	86,2	0,7	0,38-1,27	0,2922	EU	G+	172	100	151	100	1,14	0,02-57,79	1
Afro		94	87	69	92	0,58	0,21-1,60	0,3423	Afro		110	100	76	100	1,44	0,03-73,66	1
Total		175	63,2	134	58,8	1,2	0,84-1,72	0,3148	Total		12	4,3	11	4,8	0,89	0,39-2,06	0,8322
EU	T+	114	66,7	87	57,2	1,49	0,95-2,35	0,0858	EU	A+	4	2,3	6	4	0,58	0,16-2,08	0,5238
Afro		62	57,4	45	60	0,9	0,49-1,64	0,7619	Afro		9	8,2	5	6,6	1,27	0,41-3,94	0,7826

continua



TABELA 8 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES PARA OS SNPs DE CD33.

										conclusão									
<i>rs35112940</i>										<i>rs1803254</i>									
		Pacientes		Controles							Pacientes		Controles						
		n	%	n	%	OR	95% IC	<i>p</i>		n	%	n	%	OR	95% IC	<i>p</i>			
Total		218	78,1	176	76,2					Total	155	55,4							
EU	GG	127	73,8	106	70,2					EU	GG	100	57,8	109	72,2				
Afro		94	84,7	66	85,7					Afro		61	55	36	46,8				
Total		56	20,1	50	21,6	0,90	0,59-1,39	0,6614		Total	90	32,1	76	32,9	1,09	0,75-1,60	0,6982		
EU	AG	42	24,4	40	26,5	0,88	0,53-1,45	0,6096		EU	CG	56	32,4	36	23,8	1,7	1,03-2,79	<b>0,0451</b>	
Afro		15	13,5	11	14,3	0,96	0,41-2,22	1		Afro		38	34,2	38	49,4	0,59	0,32-1,09	0,1213	
Total		5	1,8	5	2,2	0,81	0,23-2,83	0,7580		Total	35	12,5	12	5,2	2,69	1,34-5,39	<b>0,0043</b>		
EU	AA	3	1,7	5	3,3	0,50	0,12-2,15	0,4760		EU	CC	17	9,8	6	4	3,09	1,17-8,14	<b>0,0263</b>	
Afro		2	1,8	0	0					Afro		12	10,8	3	3,9	2,36	0,62-8,93	0,2521	
Total		492	88,2	402	87					Total	400	71,4	362	78,4					
EU	G	296	86	252	83,4					EU	G	256	74	254	84,1				
Afro		203	91,4	143	92,9					Afro		160	72,1	110	71,4				
Total		66	11,8	60	13	0,90	0,62-1,31	0,6329		Total	160	28,6	100	21,6	1,45	1,09-1,93	<b>0,0116</b>		
EU	A	48	14	50	16,6	0,82	0,53-1,26	0,3803		EU	C	90	26	48	15,9	1,86	1,26-2,75	<b>0,0020</b>	
Afro		19	8,6	11	7,1	1,22	0,56-2,64	0,7010		Afro		62	27,9	44	28,6	0,97	0,61-1,53	0,9076	
Total		274	98,2	226	97,8	1,21	0,35-4,24	0,7610		Total	245	87,5	219	94,8	0,38	0,19-0,76	<b>0,0052</b>		
EU	G +	169	98,3	146	96,7	1,93	0,45-8,21	0,4807		EU	G +	156	90,2	145	96	0,38	0,15-0,99	0,0506	
Afro		109	98,2	77	100	0,28	0,01-5,97	0,5138		Afro		99	89,2	74	96,1	0,33	0,09-1,23	0,1046	
Total		61	21,9	55	23,8	0,90	0,59-1,36	0,6714		Total	125	44,6	88	38,1	1,31	0,92-1,87	0,1495		
EU	A +	45	26,2	45	29,8	0,83	0,51-1,36	0,5342		EU	C +	73	42,2	42	27,8	1,9	1,19-3,02	<b>0,0076</b>	
Afro		17	15,3	11	14,3	1,09	0,48-2,47	1		Afro		50	45	41	53,2	0,72	0,40-1,29	0,3005	

D = DEL PARA *rs34912427*. OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; *p* = VALOR DE *p*. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE *p* FIXADO EM 0.05.



OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS;  $p$  = VALOR DE  $p$ . VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE  $p$  FIXADO EM 0.05. NO LADO ESQUERDO, AS COMPARAÇÕES PARA CADA PAR DE SNPs ESTÃO ESTRATIFICADAS SEGUNDO O GENÓTIPO DO PRIMEIRO SNP, E NO LADO ESQUERDO AS COMPARAÇÕES ESTÃO ESTRATIFICADAS SEGUNDO O GENÓTIPO DO SEGUNDO SNP. NAS ANÁLISES DE GENÓTIPOS COMPOSTOS, AS ANÁLISES NÃO SÃO ESTRATIFICADAS. NA ANÁLISE DE *rs273640* E *rs3865444*, POR EXEMPLO, O NÚMERO DE PORTADORES DE *rs273640* T+, *rs3865444* G+ E DE PORTADORES DE *rs273640* GG, *rs3865444* TT É COMPARADO ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

TABELA 10 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÕES E FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS 10 SNPs DE *CD33* (*rs273640-rs3826656-rs3865444-rs2455069-rs11882250-rs7256496-rs34912427-rs58981829-rs35112940-rs1803254*).

		TOTAL							EU							
		Pacientes		Controles		OR	95% IC	$p$	Pacientes		Controles		OR	95% IC	$p$	
		n	%	n	%				n	%	n	%				
1	<i>GGGATACGGG</i>	105	18,9	96	20,8	0,86	0,65-1,21	0,4770	<i>GGGATACGGG</i>	71	20,8	66	21,7	0,94	0,65-1,38	0,7733
2	<i>GATATATGAG</i>	60	10,8	56	12,1	0,88	0,60-1,29	0,5525	<i>GATATATGAG</i>	43	12,6	49	16,1	0,75	0,48-1,16	0,2155
3	<i>TAGGTACGGG</i>	159	28,6	142	30,7	0,9	0,69-1,18	0,4904	<i>TAGGTACGGG</i>	98	28,7	105	34,5	0,76	0,55-1,06	0,1263
4	<i>TAGGCATAGG</i>	9	1,6	10	2,2	0,74	0,30-1,85	0,6432	<i>TAGGCATAGG</i>	4	1,2	5	1,6	0,71	0,19-2,66	0,7413
5	<i>GATATATGGC</i>	115	20,7	69	14,9	1,49	1,07-2,06	<b>0,0179</b>	<i>GATATATGGC</i>	71	20,8	34	11,2	2,08	1,34-3,24	<b>0,0013</b>
6	<i>TAGGTATGGC</i>	5	0,9	5	1,1	0,83	0,24-2,88	0,7625	<i>GATATATGGG</i>	15	4,4	10	3,3	1,35	0,60-3,05	0,5429
7	<i>GATATATGGG</i>	22	4	15	3,2	1,23	0,63-2,40	0,6156	<i>GAGATACGGG</i>	9	2,6	7	2,3	1,15	0,42-3,12	0,8067
8	<i>GAGATACGGG</i>	21	3,8	17	3,7	1,03	0,54-1,97	1	<i>GAGATACGGC</i>	5	1,5	4	1,3	1,11	0,30-4,18	1
9	<i>TAGGTGCGGG</i>	3	0,5	11	2,4	0,22	0,06-0,80	<b>0,0144</b>	<i>TAGGTGCGGG*</i>	0	0	6	2	0,07	0,00-1,20	<b>0,0106</b>
10	<i>GAGATACGGC</i>	16	2,9	8	1,7	1,68	0,71-3,97	0,3003								
11	<i>TAGATGCGGG</i>	7	1,3	5	1,1	1,17	0,37-3,70	1								
12	<i>GGGATACGGC</i>	4	0,7	5	1,1	0,66	0,18-2,48	0,7391								

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS;  $p$  = VALOR DE  $p$ . VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE  $p$  FIXADO EM 0.05. A LISTA DE HAPLÓTIPOS NÃO INCLUI TODOS OS HAPLÓTIPOS POSSÍVEIS, JÁ QUE ALGUNS DELES SÃO MUITO RAROS PARA SEREM CONSIDERADOS NAS ANÁLISES. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS UTILIZANDO A SOMA DE TODOS OS OUTROS HAPLÓTIPOS COMO REFERÊNCIA.

TABELA 11 - ANÁLISES DE ASSOCIAÇÕES E FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS 4 SNPs DE CD33 ASSOCIADOS COM PF (rs273640-rs3865444-rs2455069-rs1803254).

	TOTAL							EU							
	Pacientes		Controles		OR	95% IC	p	Pacientes		Controles		OR	95% IC	p	
	n	%	n	%				n	%						
TGGC	8	1,4	5	1,1	1,33	0,43-4,11	0,7813	TGGC	4	1,2	2	0,66	1,79	0,32-9,82	0,6893
GTAC	122	22	75	16	1,45	1,05-1,99	<b>0,0255</b>	GTAC	72	21	37	12,3	1,92	1,25-2,96	<b>0,0031</b>
GGAC	25	4,5	17	3,7	1,23	0,66-2,31	0,5319	GGAC	12	3,5	7	2,32	1,54	0,60-3,97	0,4854
TGGG	173	31	169	37	0,78	0,60-1,02	0,0716	TGGG	102	30	121	40,1	0,64	0,46-0,89	<b>0,0080</b>
GTAG	81	15	70	15	0,95	0,67-1,35	0,7912	GTAG	58	17	58	19,2	0,87	0,58-1,29	0,5377
TGAG	8	1,4	7	1,5	1,06	0,38-2,95	1	GGAG	84	25	73	24,2	1,03	0,72-1,48	0,9268
GGAG	130	23	114	25	0,93	0,70-1,24	0,6581								

OR = RAZÃO DE CHANCES (ODDS RATIO); IC = INTERVALO DE CONFIANÇA; N = NÚMERO DE ALELOS OU INDIVÍDUOS; p = VALOR DE p. VALORES EM NEGRITO INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE p FIXADO EM 0.05. A LISTA DE HAPLÓTIPOS NÃO INCLUI TODOS OS HAPLÓTIPOS POSSÍVEIS, JÁ QUE ALGUNS DELES SÃO MUITO RAROS PARA SEREM CONSIDERADOS NAS ANÁLISES. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS UTILIZANDO A SOMA DE TODOS OS OUTROS HAPLÓTIPOS COMO REFERÊNCIA.

TABELA 12 – ANOTAÇÕES FUNCIONAIS E ASSOCIAÇÕES COM EXPRESSÃO GÊNICA, PF E OUTRAS DOENÇAS DOS SNPs ASSOCIADOS COM EXPRESSÃO DE *LAIR1*, *LAIR2* E *CD33* E/OU COM PF.

SNP	Gene	DL com*	Associação com PF	Outras doenças	Expressão	Expressão em outros estudos	Anotação funcional
<i>rs1803254</i>	<i>CD33</i>		Alelo C associado com maior risco		Alelo C associado com maior expressão de <i>CD33m</i>	Alelo C associado com menor expressão proteica de CD33 em LMA	Localizado na região 3'UTR de <i>CD33</i> . Região de cromatina aberta, rica em marcações de histonas caracterpisticas de acentuadores transcricionais. Alelo G elimina a ligação com miR-582-5p e cria ligação para miR-374c-3p. Em DL com <i>rs989502</i> , um eQTL de <i>CD33</i> no fígado e monócitos e afeta ligação de fatores de trancrrição
<i>rs3826656</i>	<i>CD33</i>		Alelo G associado com maior risco na presença de <i>rs35112940 A</i>	Alelo G associado a risco à doença de Alzheimer			Localizado em uma região hipersensível à DNase I. Em DL com <i>rs273635</i> , localizado na região a montante de <i>CD33</i> . Ambos os SNPs alteram sítios de ligação com fatores de transcrição e são eQTL de <i>CD33</i> em monócitos
<i>rs34912427</i>	<i>CD33</i>	<i>rs3865444</i>	Alelo T associado com maior risco na presença de <i>rs3826656 G</i>		Alelo T associado com maior expressão de <i>CD33m</i> , e com menor expressão de <i>CD33M+CD33m</i>		Resultados redundantes com os de <i>rs3865444</i>
<i>rs35112940</i>	<i>CD33</i>		Alelo A associado com maior risco na presença de <i>rs3826656 G</i>	Alelo A associado a risco à LMA	Alelo A associado com maior expressão de <i>CD33m</i>	Alelo A associado com menor expressão proteica de CD33 em LMA	SNP não-sinônimo (Arg302Gly) localizado no sexto éxon de <i>CD33</i> , possivelmente deletério para <i>CD33m</i> . Localizado em uma região de cromatina aberta, hipersensível à DNaseI, e supostamente altera a recomposição alternativa através da modificação do sítio de ligação com acentuadores/silenciadores
<i>rs2455069</i>	<i>CD33</i>	<i>rs273640</i>	Alelo G associado com proteção		Alelo G associado com menor expressão de <i>CD33m</i>	Alelo G associado com menor expressão proteica de CD33 em LMA	SNP não-sinônimo (Arg69Gly) localizado no éxon 2. Afeta a recomposição alternativa de <i>CD33</i> , está localizado em um sítio hipersensível à DNase I e rico em marcações de histonas típicas de regiões promotoras e acentuadoras, é um eQTL de <i>CD33</i> em monócitos e afeta a ligação para diversos fatores de transcrição, como NF-kappaB. <i>rs1697553</i> , em DL com o <i>rs2455069</i> e <i>rs273640</i> , é um eQTL para <i>CD33</i> em monócitos e está associado com a doença de Alzheimer. <i>rs2459141</i> também está em DL com os SNPs supracitados, está localizado em uma região rica em marcações de histonas de promotores e acentuadores, ligada por diversas proteínas, e hipersensível à DNase I
<i>rs273640</i>	<i>CD33</i>	<i>rs2455069</i>	Alelo T associado com proteção		Alelo T associado com menor expressão de <i>CD33m</i>		Resultados redundantes com os de <i>rs2455069</i>
<i>rs3865444</i>	<i>CD33</i>	<i>rs34912427</i>	Alelo G associado a proteção	Alelo G associado com maior susceptibilidade a doença de Alzheimer e LMA	Alelo G associado com menor expressão de <i>CD33m</i> , e com maior expressão de <i>CD33M+CD33m</i>	Alelo G associado com maior expressão de CD33 a nível de RNAm e proteína, maior expressão do éxon 2 em monócitos, menor <i>CD33m</i> (RNAm) em monócitos, e com maior expressão proteica de CD33 em LMA	Em DL com <i>rs12459419</i> , um SNP não-sinônimo(Ala14Val) localizado no éxon 2 que afeta a excisão do mesmo éxon

continua

TABELA 12 – ANOTAÇÕES FUNCIONAIS E ASSOCIAÇÕES COM EXPRESSÃO GÊNICA, PF E OUTRAS DOENÇAS DOS SNPs ASSOCIADOS COM EXPRESSÃO DE *LAIR1*, *LAIR2* E *CD33* E/OU COM PF.

SNP	Gene	DL com*	Associação com PF	Outras doenças	Expressão	Expressão em outros estudos	Anotação funcional
<i>rs56802430</i>	<i>LAIR1</i>		Alelo G associado com maior risco		Alelo G associado com maior expressão		SNP intrônico para duas variantes de RNAm de <i>LAIR1</i> (variante f e g), e a montante (5') de <i>LAIR1</i> para todas as outras variantes. Muda o motivo de ligação ao fator de transcrição GR. Localizado próximo a <i>rs7250548</i> , com o qual está em DL. <i>rs250548</i> muda o sítio de ligação para o fator de transcrição Ikaros 1, expresso em células hematopoiéticas e que funciona como regulador da diferenciação linfocítica
<i>rs11084332</i>	<i>LAIR1</i>		Alelo C associado com proteção				SNP intrônico para duas variantes de RNAm de <i>LAIR1</i> (variante f e g), e a montante (5') de <i>LAIR1</i> para todas as outras variantes. Localizado em região rica em marcações de histonas características de promotores eacentuadores transcricionais, hipersensível à DNase I, e ligada por proteínas (entre elas o fator de transcrição CEBPB).
<i>rs3826753</i>	<i>LAIR1</i>				Alelo A associado com menor expressão		Localizado na região 3' UTR de <i>LAIR1</i> , ligado pelo pelo fator de transcrição CEBPB . Alelo A elimina a ligação para miR-1204 e miR-6717-5p, mas pode criar ligação para outros microRNAs
<i>rs74463408</i>	<i>LAIR1</i>				Alelo C associado com menor expressão		SNP não-sinônimo, localizado no quarto éxon de <i>LAIR1</i> (para LAIR-1a e LAIR-1b), em região com marcações de histonas características de promotores eacentuadores transcricionais.
<i>rs3745444</i>	<i>LAIR1</i>				Alelo C associado com menor expressão		SNP intrônico para duas variantes de RNAm de <i>LAIR1</i> (variante f e g), e a montante (5') de <i>LAIR1</i> para todas as outras variantes. Localizado em região rica em marcações de histonas características de promotores eacentuadores transcricionais, hipersensível à DNase I.

continua

TABELA 12 – ANOTAÇÕES FUNCIONAIS E ASSOCIAÇÕES COM EXPRESSÃO GÊNICA, PF E OUTRAS DOENÇAS DOS SNPs ASSOCIADOS COM EXPRESSÃO DE *LAIR1*, *LAIR2* E *CD33* E/OU COM PF.

conclusão

SNP	Gene	DL com*	Associação com PF	Outras doenças	Expressão	Expressão em outros estudos	Anotação funcional
<i>rs2042287</i>	<i>LAIR2</i>		Alelo G associado com maior risco, em homozigose, na presença de <i>rs2287828 T</i>				Localizado a montante de <i>LAIR2</i> , em região rica em marcações de histonas características de promotores e acentuadores transcricionais, histonas bivalentes em monócitos, região hipersensível à DNase I. Muda os motivos para ligação de fatores de transcrição.
<i>rs2287828</i>	<i>LAIR2</i>		Alelo T associado com maior risco	Associado com espondilite anquilosante			Localizado a montante de <i>LAIR2</i> , em região rica em marcações de histonas características de promotores e acentuadores transcricionais, histonas bivalentes em monócitos, região hipersensível à DNase I.
<i>rs2277974</i>	<i>LAIR2</i>		Alelo G de <i>rs114834145</i> tem efeito de risco apenas na presença de alelo A de <i>rs2277974</i>				SNP intrônico, localizado em região rica em marcações de histonas características de promotores e acentuadores transcricionais, e hipersensível à DNase I. Em monócitos, apresenta histonas Polycomb. Afeta a recomposição alternativa de <i>LAIR2</i> , e está em DL com <i>rs2277973</i> , um eQTL de <i>LAIR2</i> em células linfoblastoides. Também afeta os motivos de ligação a fatores transcricionais.
<i>rs114834145</i>	<i>LAIR2</i>		Alelo A associado com maior risco, em homozigose, na presença de <i>rs2287828 T</i>				SNP intrônico, localizado em região rica em marcações de histonas características de promotores e acentuadores transcricionais. Em monócitos, apresenta histonas Polycomb. Também afeta os motivos de ligação a fatores transcricionais.
<i>rs2277971</i>	<i>LAIR2</i>					Alelo T associado com menor expressão	SNP intrônico, localizado em região rica em marcações de histonas características de promotores e acentuadores transcricionais. Em monócitos, apresenta histonas Polycomb.

\*Considerados apenas os SNPs analisados nesse estudo. Demais SNPs em DL estão listados nas tabelas suplementares.

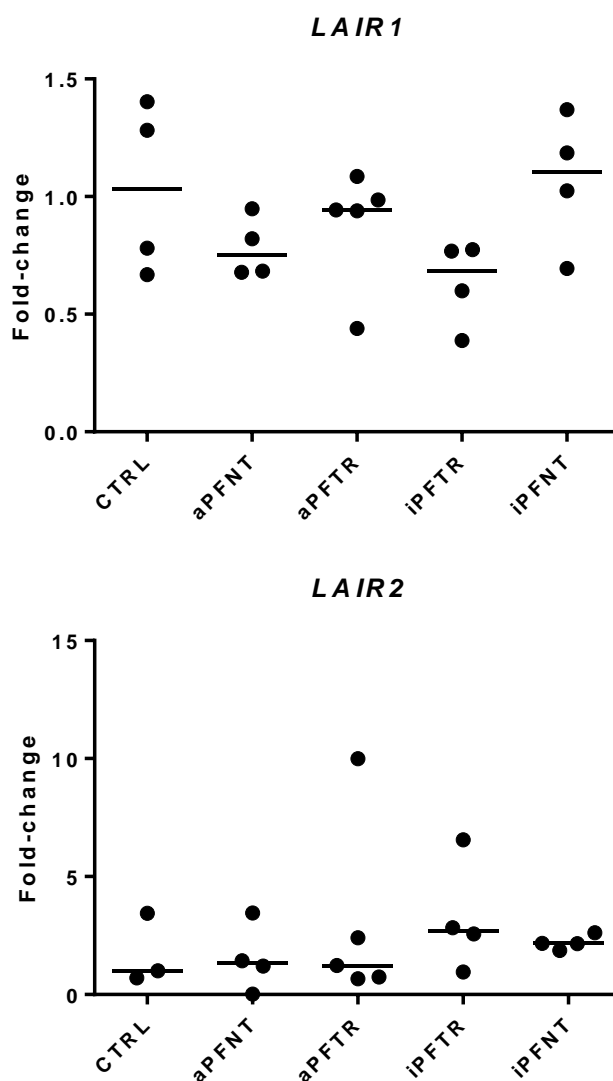


FIGURA 1 - NÍVEIS RELATIVOS DE *LAIR1* E *LAIR2* EM PACIENTES DE PF E CONTROLES SAUDÁVEIS. NÍVEIS RELATIVOS DE *LAIR1* E *LAIR2* EM CONTROLES SAUDÁVEIS (CTRL), PACIENTES COM PÊNFIGO ATIVO SEM TRATAMENTO (aPFNT), PACIENTES COM PÊNFIGO ATIVO SOB TRATAMENTO (aPFTR), PACIENTES SEM LESÃO (PÊNFIGO INATIVO) SOB TRATAMENTO (iPFTR) E PACIENTES SEM LESÃO SEM TRATAMENTO (iPFNT). OS GRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES NÃO EXPRESSAM NÍVEIS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DE *LAIR1*. OS VALORES DE FOLD-CHANGE FORAM CALCULADOS PELO MÉTODO  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . AS BARRAS HORIZONTAIS INDICAM A MEDIANA. OS VALORES DE  $p$  INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE  $p$  FIXADO EM 0.05, E FORAM CALCULADOS PELO TESTE DE MANN-WHITNEY.



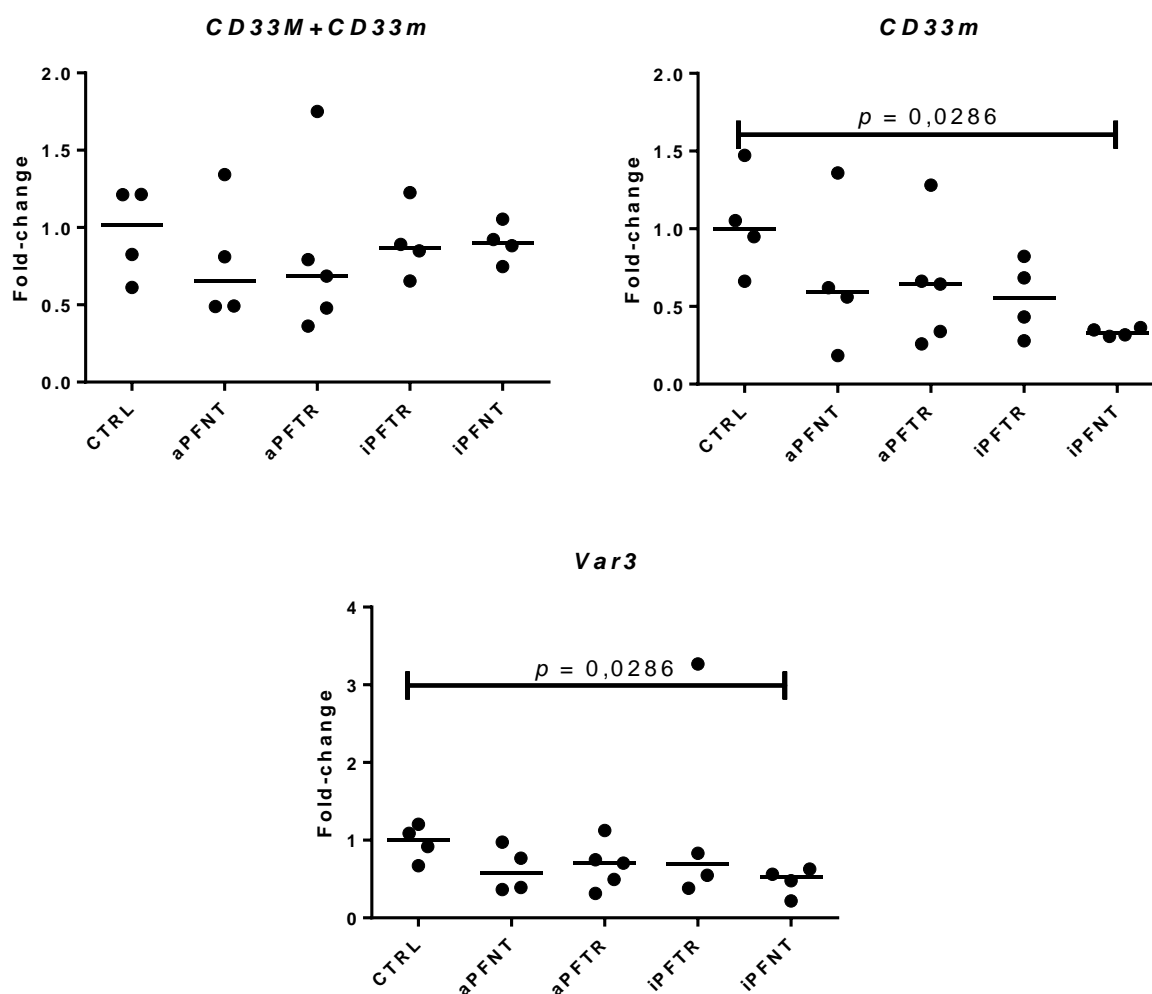


FIGURA 2 - NÍVEIS RELATIVOS DE *CD33M+CD33m*, *CD33m* AND *VAR3* EM PACIENTES DE PF E CONTROLES SAUDÁVEIS. NÍVEIS RELATIVOS DE VARIANTES DE RNAM DE *CD33* EM CONTROLES SAUDÁVEIS (CTRL), PACIENTES COM PÊNFIGO ATIVO SEM TRATAMENTO (APFNT), PACIENTES COM PÊNFIGO ATIVO SOB TRATAMENTO (APFTR), PACIENTES SEM LESÃO (PÊNFIGO INATIVO) SOB TRATAMENTO (IPFTR) E PACIENTES SEM LESÃO SEM TRATAMENTO (IPFNT). A OS GRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES NÃO EXPRESSAM NÍVEIS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES DE *CD33M+CD33m*. B CONTROLES SAUDÁVEIS APRESENTAM NÍVEIS SIGNIFICATIVAMENTE MAIORES DE *VAR3* EM RELAÇÃO A PACIENTES SEM LESÃO SEM TRATAMENTO. C CONTROLES SAUDÁVEIS APRESENTAM NÍVEIS SIGNIFICATIVAMENTE MAIORES DE *CD33m* EM RELAÇÃO A PACIENTES SEM LESÃO SEM TRATAMENTO. OS VALORES DE FOLD-CHANGE FORAM CALCULADOS PELO MÉTODO  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . AS BARRAS HORIZONTAIS INDICAM A MEDIANA. OS VALORES DE  $p$  INDICAM SIGNIFICÂNCIA COM VALOR DE  $p$  FIXADO EM 0.05, E FORAM CALCULADOS PELO TESTE DE MANN-WHITNEY.

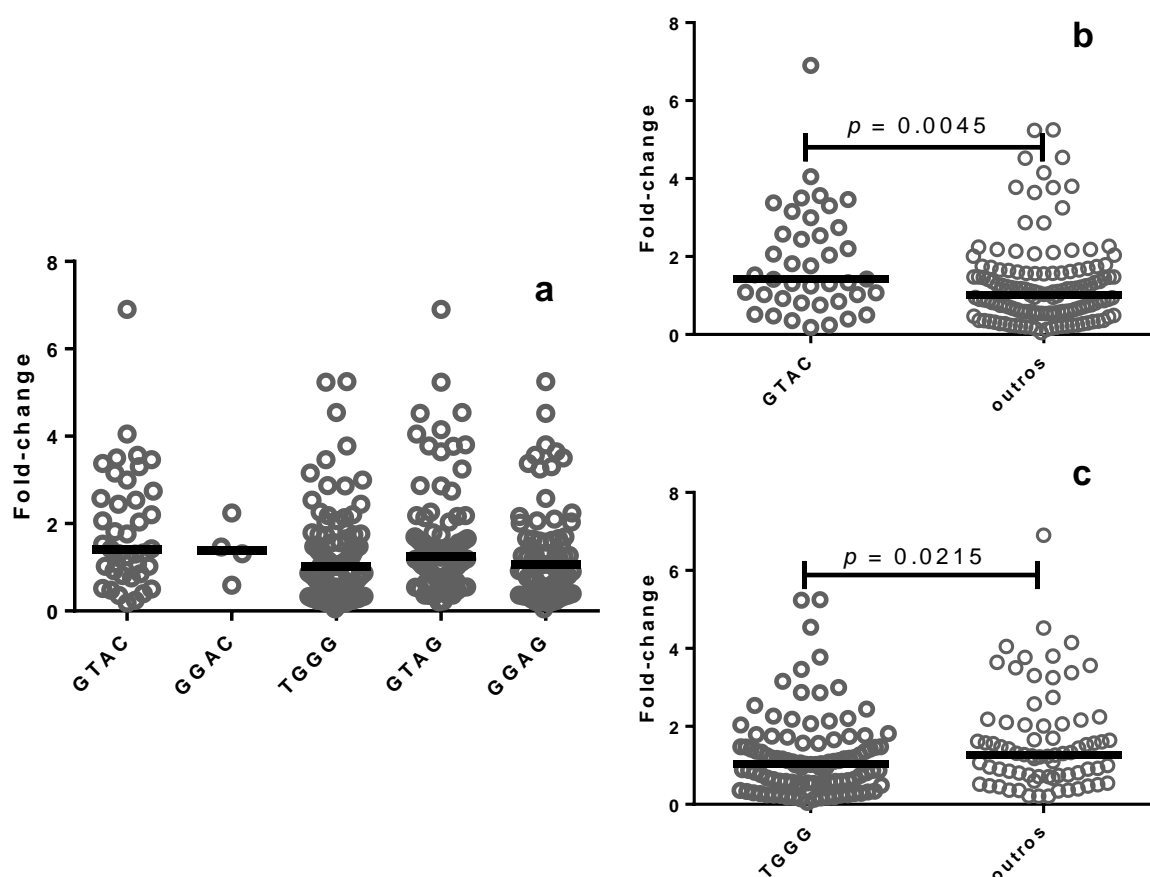


FIGURA 3 - NÍVEIS RELATIVOS DO TRANSCRITO *CD33m* EM PBMC DE CONTROLES SAUDÁVEIS PORTADORES DE HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS SNPs DE *CD33* ASSOCIADOS COM PF. a NÍVEIS RELATIVOS DE *CD33m* EM PORTADORES DOS HAPLÓTIPOS MAIS FREQUENTES. b NÍVEIS RELATIVOS DE *CD33m* EM PORTADORES E NÃO-PORTADORES DO HAPLÓTIPO ASSOCIADO COM MAIOR SUSCEPTIBILIDADE AO PF. c NÍVEIS RELATIVOS DE *CD33m* EM PORTADORES E NÃO-PORTADORES DO HAPLÓTIPO ASSOCIADO COM MENOR SUSCEPTIBILIDADE AO PF. OS VALORES DE FOLD-CHANGE FORAM CALCULADOS PELO MÉTODO  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . AS BARRAS HORIZONTAIS INDICAM A MEDIANA. APENAS OS SNPs QUE ALTERAM OS NÍVEIS DE *CD33M+CD33m* E/OU *CD33m* SÃO MOSTRADOS, MAS OS RESULTADOS SÃO RELATIVOS AOS NÍVEIS DE *CD33M+CD33m*. OS VALORES DE  $p$  INDICAM SIGNIFICÂNCIA A COM VALOR DE  $p$  FIXADO EM 0.05, E FORAM CALCULADOS PELO TESTE DE MANN-WHITNEY.

## APÊNDICE 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### AMOSTRAGEM POPULACIONAL

#### *Estudo de associação caso-controle*

A amostra é constituída de 359 pacientes com PF e 249 indivíduos saudáveis residentes nas regiões endêmicas. Os indivíduos foram classificados de acordo com a etnia em eurobrasileiros (EU) e afrobrasileiros (AF), ou seja, brasileiros com ancestralidade predominantemente europeia e africana, respectivamente. Foram realizadas análises estratificadas para as amostras EU e AF. Após ajuste das proporções de EU e AF em pacientes e controles para evitar associações espúrias decorrentes da estratificação étnica, nós analisamos também a amostra total (EU + AF), que contou com 233 controles saudáveis e 282 pacientes. Os indivíduos amostrados são não consanguíneos entre si, residentes nas mesmas regiões geográficas e pareados quanto à origem étnica. Os pacientes não têm histórico familiar de doença autoimune, apesar de alguns pacientes possuírem parentes consanguíneos com PF: um indivíduo possui um parente de segundo-grau e oito indivíduos possuem parentes de primeiro grau com PF. Os pacientes foram diagnosticados com base em investigações clínicas e por imunohistoquímica e/ou histopatologia. As amostras de sangue para extração de DNA vêm sendo coletadas desde a década de 1980 pela equipe do LGMH principalmente no Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande, MS), mas também no Hospital de Dermatologia Sanitária de Piraquara (Piraquara, PR), no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, SP), no Lar da Caridade (Uberaba, MG) e no Hospital de Clínicas da UFPR (Curitiba, PR). Todos os indivíduos são voluntários e assinaram um termo de consentimento para participação em pesquisa, além de terem sido extensamente averiguados (fichas de averiguação nos ANEXOS 1 e 2). O DNA das amostras foi extraído a partir de leucócitos de sangue periférico através da técnica que utiliza fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (FCI) (SAMBROOK et al., 1989). A concentração de uso de todas as amostras foi ajustada para 20 µg/ml.

Este trabalho se insere no projeto "Genes e suas variações: análise molecular, evolutiva e funcional, em populações e em doenças", número CAAE

02727412.4.0000.0096, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas da UFPR em 18 de dezembro de 2013 pelo parecer 505.988.

#### *Análise de expressão de RNAm em pacientes de PF*

Para a análise dos níveis de RNAm em pacientes de PF, os indivíduos foram classificados quanto à presença de lesões e tratamento no momento da coleta. Foram considerados os seguintes subgrupos: PF com lesão ativa sob tratamento imunossupressor (aPFTR), pacientes de PF sem lesão sob tratamento imunossupressor (iPFTR), pacientes com lesão ativa sem tratamento imunossupressor (aPFNT) e pacientes sem lesão sem tratamento (iPFNT), além de controles saudáveis. A inclusão de indivíduos no estudo seguiu os mesmos critérios citados no item 5.1.1, com exceção do local de moradia dos indivíduos controles, que nesse caso não são residentes das áreas endêmicas. Os indivíduos incluídos nas análises de expressão gênica foram pareados quanto ao sexo, idade, tipo e posologia de tratamento e atividade da doença. Sangue venoso foi coletado de cada indivíduo, para posterior isolamento de PBMC e extração de RNA total. A amostra está detalhada na (TABELA 1).

#### *Estudo de associação de polimorfismos genéticos com a expressão de RNAm*

O estudo de associação entre SNPs e expressão de *LAIR1*, *LAIR2* e *CD33* em nível de RNAm foi realizado com uma amostra de 177 indivíduos saudáveis, residentes em sua maioria na cidade de Curitiba e arredores e não consanguíneos entre si. Grande parte das amostras de sangue (70%) foi coletada no Biobanco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR, e o restante dos indivíduos foram recrutados dentro da comunidade universitária de estudantes, servidores e professores e de seus contatos externos. 84% dos indivíduos são de ancestralidade predominantemente europeia, e 54% são mulheres. Todos os indivíduos eram livres de doenças autoimunes; livres de doenças para as quais haja evidência de um componente genético, e não estavam recebendo tratamento que pudesse afetar as respostas imunes. Todos os participantes são voluntários e assinaram um termo de consentimento para participação em pesquisa, além de terem sido averiguados.

O DNA foi extraído a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a lisadas em TRI ou TRIzol (Ambion, Foster City, CA), seguindo instruções do fabricante. Brevemente, inicialmente o RNA era extraído e, a partir da

interfase/fase orgânica, o DNA era precipitado com etanol e lavado com uma solução de citrato de sódio e etanol para remover impurezas, e então solubilizado. A concentração de uso de todas as amostras foi ajustada para 20 µg/ml.

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES PARA A ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE RNAm.

Código da amostra	Idade	Sexo	Atividade da doença	Tratamento*
P325CEA	47	M	PF ativo	-
P362BCP 25/11/14	54	F	PF ativo	-
P391XQG	15	F	PF ativo	-
P414AIK***	28	F	PF ativo	-
P392KEB	38	M	PF inativo	10mg
P386JGY	32	M	PF inativo	25mg
P229MFF	52	F	PF inativo	10mg
P382SCD	17	F	PF inativo	30 mg
P508ASC	39	M	PF inativo	-
P242MRS	62	F	PF inativo	-
P380MQJ	17	F	PF inativo	-
P307LRS	31	F	PF inativo	-
P399LAF	33	M	PF ativo	20mg
P342GVN	56	F	PF ativo	60 mg
P383EYI	15	F	PF ativo	60 mg
P393OKQ	32	F	PF ativo	40mg
P396NMK	31	F	PF ativo	60mg
410ERA	44	M	Controle	
068NBP	58	F	Controle	
100VSR	56	F	Controle	
430LCP	25	F	Controle	

\*Tratamento de corticoide oral sistêmico (prednisona)

## SELEÇÃO DOS SNPs

A seleção dos SNPs foi realizada através do navegador genômico Ensembl, no banco de dados dbSNP, que contém variantes genotipadas em sua maioria pelos projetos HapMap e 1000genomes. Numa primeira triagem, foram selecionados todos os SNPs localizados entre aproximadamente 3000 pb a montante do sítio de início de transcrição e 1000 pb a jusante dos sítios de terminação dos genes. Em seguida, foi realizada uma nova seleção de SNPs com base no grau de polimorfismo dos marcadores e na predição *in silico* de suas funções. Foram

selecionados os SNPs não-sinônimos e/ou funcionais com frequência do alelo menos frequente (MAF, do inglês *minor allele frequency*) maior que 2,5%; e os SNPs sinônimos e não-funcionais com MAF maior que 5% em pelos menos duas das populações de interesse. As quatro populações de interesse consideradas foram norte-americanos eurodescendentes (CEU), colombianos (CLM), mexicanos (MXL) e africanos Yoruba (YRI) do banco de dados 1000 Genomes. Além disso, os SNPs com MAF maior que 2,5% e previamente associados a doenças também foram selecionados. Entre os SNPs selecionados, a ordem de prioridade para inclusão no estudo foi definida a partir da análise de desequilíbrio de ligação, com o programa Haploview (BARRETT et al., 2004). Desta forma, foram considerados prioritários os SNPs rótulo ( $r^2 \geq 0.8$ ) em pelo menos duas das populações de interesse. Por fim, foram genotipados apenas os SNPs compatíveis com a plataforma de genotipagem iPLEX MassARRAY.

Os SNPs selecionados estão listados na (TABELA 2), e representados nos esquemas das figuras FIGURA 3 (LAIR1), FIGURA 4 (LAIR2) e FIGURA 5 (CD33).

## GENOTIPAGEM

Os indivíduos foram genotipados pelo método iPLEX MassARRAY (Sequenom, San Diego, CA). Este método permite a genotipagem simultânea de até 40 SNPs (BRÁDIC et al., 2011), proporcionando genotipagem em média escala rápida e eficiente. Parte das genotipagens foi realizada no Laboratório Multiusuário de Genotipagem e Sequenciamento (LMGS), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e parte no Instituto Liggins, Universidade de Auckland, Nova Zelândia.

O ensaio iPLEX MassARRAY consiste em uma reação inicial de PCR *multiplex* loco-específica, seguida por uma purificação do produto com uma enzima fosfatase alcalina. A seguir, realiza-se o ensaio iPLEX de extensão. Nessa etapa, oligonucleotídeos de extensão adjacentes ao sítio do SNP são estendidos com um único nucleotídeo complementar ao nucleotídeo da fita molde. A diferença de massa entre os produtos amplificados permite a identificação dos diferentes alelos após análise por ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF). Para análise dos resultados foi utilizado o programa MassARRAY Typer 4.0 (Sequenom, San Diego,

CA). O desenho do ensaio é informado previamente, e o programa faz uma previsão da massa esperada para cada alelo de cada loco. Para cada SNP e indivíduo é criado um gráfico de picos, através dos quais pode-se verificar a qualidade das genotipagens. O programa também produz, para cada SNP, um gráfico representativo dos genótipos.

TABELA 2. SNPS SELECIONADOS E RESPECTIVAS SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA GENOTIPAGEM.

Gene	SNP ID	Função	Posição*
CD33	<i>rs35112940</i>	Não sinônimo	51235662
	<i>rs34912427</i>	Intrônico	51231768
	<i>rs3865444</i>	Região a montante	51224706
	<i>rs2455069</i>	Não sinônimo	51225385
	<i>rs58981829</i>	Não sinônimo	51235210
	<i>rs7256496</i>	Intrônico	51226922
	<i>rs273640</i>	Região a montante	51222568
	<i>rs3826656</i>	Região a montante	51223357
	<i>rs11882250</i>	Não sinônimo	51226338
	<i>rs1803254</i>	Região 3'UTR	51239889
LAIR1	<i>rs56802430</i>	Intrônico, região a montante	54366807
	<i>rs11084332</i>	Intrônico, região a montante	54369204
	<i>rs3826753</i>	Região 3'UTR	54354442
	<i>rs74463408</i>	Não sinônimo	54360057
	<i>rs3745444</i>	Intrônico	54360742
	<i>rs7257187</i>	Sinônimo	54355963
LAIR2	<i>rs2042287</i>	Região 5' UTR	54502872
	<i>rs2287828</i>	Região 5' UTR	54502908
	<i>rs114834145</i>	Intrônico	54508360
	<i>rs2277974</i>	Intrônico	54508187
	<i>rs2277971</i>	Intrônico	54508403
	<i>rs73070113</i>	Intrônico	54502956
	<i>rs61737751</i>	Sem sentido	54508046
	<i>rs34429135</i>	Não sinônimo	54508164

\* UCSC Genome Browser assembly ID: hg38

## SEPARAÇÃO CELULAR E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE RNAm

Para a análise dos níveis de RNAm, foram coletados de 8 a 12 ml de sangue periférico em tubos contendo EDTA. Posteriormente foi realizado o isolamento das PBMC por meio de centrifugação em gradiente de densidade de Histopaque-1077 (Sigma; densidade = 1,077 g/ml). A estocagem do sangue era feita em temperatura

ambiente, e o isolamento das células foi realizado dentro de no máximo 12h após a coleta de sangue. A concentração celular era determinada a partir da contagem em câmara de Neubauer.

As células isoladas eram então lisadas e estabilizadas com os reagentes TRI ou TRizol (Ambion, Foster City, CA) e congeladas a -80°C para posterior extração de RNA. O RNA era precipitado com isopropanol, lavado com etanol e solubilizado em água livre de nucleases, segundo o protocolo de extração de RNA que acompanha o reagente TRI ou TRizol. A transcrição reversa do RNA total das amostras foi realizado com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Os níveis de RNAm foram mensurados pelo método de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), com a utilização de sondas de hidrólise TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), e com o *mix* TaqMan Universal Master Mix II sem UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA), no equipamento Viiia 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para o gene *CD33*, foram utilizados o ensaio TaqMan inventariado Hs00233544\_m1, que detecta *CD33M* e *CD33m* (NM\_001772.3 e NM\_001082618.1), e dois ensaios TaqMan customizados, que detectam as variantes *CD33m* (NM\_001082618.1) e *Var3* (NM\_001177608.1). Os ensaios foram desenhados através do programa Primer3Plus (ROZEN; SKALETSKY, 2000), e estão listados na (TABELA 3). Foram realizadas análises de eficiência de amplificação para ambos os ensaios customizados, com 5 pontos de diluição 1:10 (100 ng – 0.01 ng). A eficiência para o ensaio customizado de *CD33m* foi 103,12%; e a eficiência do ensaio de *Var3* foi de 102,82%. Para *LAIR1*, foi utilizado o ensaio TaqMan Hs00253790\_m1, que detecta as isoformas *LAIR-1a* (NM\_002287.3) e *LAIR-1b* (NM\_021706.2); e para *LAIR2* foi utilizado o ensaio Hs00430498\_m1, que detecta as variantes *LAIR-2a* (NM\_021270.3) e *LAIR-2b* (NM\_002288.4). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os níveis relativos de RNAm foram normalizadas pela expressão de RNAm do gene *GUSB*.



TABELA 3. SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS DE PCR E SONDAS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS DIFERENTES VARIANTES DE RNAm *CD33*.

Variantes	Oligonucleotídeos de PCR e sondas (5'-3')	
Variante 2 ( <i>CD33m</i> )	Forward	CCGCTGCTGCTACTGCTG
	Reverse	CTAGAGTGCCAGGGATGAGGA
	Sonda	TGTGGGCAGACTTGA
Variante 3 ( <i>Var3</i> )	Forward	AGGAATGACACCCACCCTACC
	Reverse	CATCATCTCCTGATCTGTTGGC
	Sonda	CCTCCCCGGTACGTTG

### ANÁLISES *IN SILICO*

Com o intuito de investigar as possíveis funções dos SNPs, foram utilizadas as seguintes ferramentas de bioinformática: HaploReg3 (WARD; KELLIS, 2012), RegulomeDB (BOYLE et al., 2012), rSNP Base (GUO et al., 2014), F-SNP (LEE; SHATKAY, 2008), miRNASNP (GONG et al., 2015), mirSNP (LIU et al., 2012), PolymiRTS (BHATTACHARYA et al., 2014), Ensembl Variant Predictor (MCLAREN et al., 2010) e Genevar (YANG et al., 2010) (TABELA 4).

TABELA 4. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA UTILIZADAS NAS ANOTAÇÕES FUNCIONAIS DOS SNPS ANALISADOS DE *CD33*, *LAIR1* E *LAIR2*.

Ferramenta	Descrição	Endereço eletrônico
HaploReg3	HaploReg é uma ferramenta utilizada para explorar anotações funcionais de variantes genéticas em blocos haplotípicos. A ferramenta informa os SNPs em DL, suas frequências, evidências do projeto ENCODE para a ligação de proteínas, regiões hipersensíveis à DNase, estado da cromatina (que permite prever regiões acentuadoras ou promotoras), e motivos de ligação de fatores de transcrição que são alterados pela variante. Utiliza dados de DL do 1000 Genomes, matrizes de peso posicional (position weight matrices, PWM) construídas com base nos dados do TRANSFAC, JASPAR e PBM (protein-binding microarrays), anotações funcionais do ENCODE, dados de GWAS, entre outros.	<a href="http://broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php">broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php</a>
RegulomeDB	Banco de dados que permite fazer a anotação funcional dos SNPs através de elementos regulatórios preditos ou validados, como regiões hipersensíveis à Dnase, sítios de ligação de fatores de transcrição e regiões promotoras. Cada SNP recebe um score que sumariza a evidência do potencial regulatório da variante. Faz a integração de diversos bancos de dados experimentais, como dados do projeto ENCODE e bancos de eQTLs, e utiliza também dados de ferramentas computacionais de predição de elementos regulatórios.	<a href="http://regulomedb.org/index">regulomedb.org/index</a>

continua

TABELA 4. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA UTILIZADAS NAS ANOTAÇÕES FUNCIONAIS DOS SNPS ANALISADOS DE *CD33*, *LAIR1* E *LAIR2*.

conclusão

rSNP Base	Banco de dados que faz a anotação funcional de SNPs com base em dados experimentais, como os do projeto ENCODE. Apresenta uma variedade de informações para os SNPs de interesse e aqueles em DL, tais como evidências de envolvimento na regulação transcricional proximal e distal, pós-transcricional, identifica eQTLs e de apontar os genes afetados pelos mesmos.	<a href="http://rsnp.psych.ac.cn/">rsnp.psych.ac.cn/</a>
F-SNP	Faz a integração de 16 ferramentas de bioinformática e bancos de dados, tais como PolyPhen, ESEFinder, Ensembl, OMIM e UCSC Genome Browser. Traz informações sobre os efeitos funcionais preditos a nível da regulação transcricional, de recomposição alternativa, traducional e pós-traducional.	<a href="http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/">compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/</a>
Ensembl Variant effect predictor	Determina o efeito de variantes genéticas em genes, transcritos e proteínas, assim como em regiões regulatórias. Utiliza diversas ferramentas de bioinformática, tais como SIFT e PolyPhen, que predizem se uma substituição de aminoácido afeta a função e estrutura proteicas.	<a href="http://ensembl.org/info/docs/tools/vep/online/input.html#ident">ensembl.org/info/docs/tools/vep/online/input.html#ident</a>
Genevar	Ferramenta que integra diversos bancos de dados, e permite a análise e visualização de associações entre variantes genéticas e expressão gênica. A busca pode ser feita através do gene ou SNP.	<a href="http://sanger.ac.uk/resources/software/genevar/">sanger.ac.uk/resources/software/genevar/</a>
miRNASNP	Permite a identificação de SNPs relacionados a microRNA, que incluem SNPs localizados em pre-microRNAs, regiões flanqueadoras de microRNAs, SNPs localizados em sequências seed e em regiões 3'UTR; e de predição dos efeitos de SNPs na interação entre microRNAs e seus alvos. Utiliza os softwares miRanda e TargetScan para predição de alvos de microRNAs.	<a href="http://bioguo.org/miRNASNP/">bioguo.org/miRNASNP/</a>
mirSNP	Permite a identificação de SNPs potencialmente localizados em sítios de interação microRNA-RNA, e permite fazer a predição dos efeitos de SNPs na ligação dos microRNAs com seus alvos (diminuição, acentuação da ligação com microRNA-alvo, eliminação ou criação de sítio de ligação). Utiliza o software miRanda para identificação de alvos de microRNAs.	<a href="http://bioinfo.bjmu.edu.cn/mirsnp/search/">bioinfo.bjmu.edu.cn/mirsnp/search/</a>
PolymiRTS	Banco de dados que permite a identificação de SNPs potencialmente localizados em sequências seed de microRNAs e em sítios-alvo. A anotação é feita com base em dados experimentais CLASH, e a predição de alvos utiliza o software TargetScan.	<a href="http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/">compbio.uthsc.edu/miRSNP/</a>

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências genotípicas, alélicas e de indivíduos portadores das variantes de *CD33*, *LAIR1* e *LAIR2* foram determinadas através de contagem direta. Para o estudo de associação, as frequências foram comparadas entre diferentes amostras de pacientes e controles através do teste exato de Fisher e análises de odds ratio

com o programa GraphPad Software 6.0, La Jolla, California, USA. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado por análise de chi-quadrado. As frequências haplotípicas foram estimadas pelo algoritmo EM (*Expectation-Maximization*) pelo programa PLINK (PURCELL et al., 2007). Análises de desequilíbrio de ligação foram computadas com o programa Haploview 4.2 (BARRETT et al., 2005). Interações epistáticas foram detectadas utilizando o programa PLINK (PURCELL et al., 2007). Análises de regressão logística binária com método stepwise foram computadas pelo programa IBM SPSS Statistics 23 Software, Chicago, USA. Os valores de Ct (cycle threshold) foram calculados pelo programa Viia 7 Software v1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA), e os dados de expressão gênica relativos foram calculados pelo método de Ct comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As eficiências de amplificação dos ensaios TaqMan customizados foram determinados utilizando o programa Viia 7 Software v1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA). O teste bicaudal não-paramétrico de Mann–Whitney foi utilizado para comparar os níveis de expressão gênica entre grupos utilizando o programa GraphPad 6.0. Para todas as análises, os valores de  $p$  inferiores a 0,05 são considerados indicativos de diferenças estatisticamente significantes.

## 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.
Volume em EDTA para DNA _____ ml, para células _____ ml.
Volume em ativador de coagulação (para soro) _____ 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:

---



---



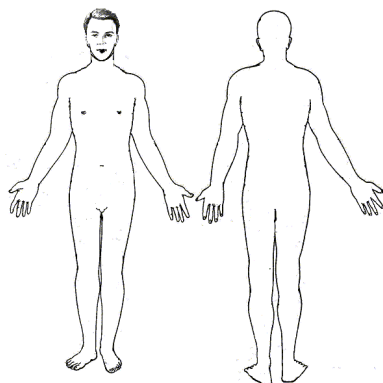
---

#### 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.



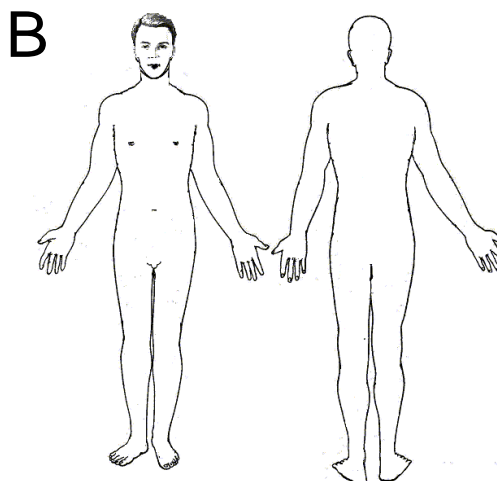
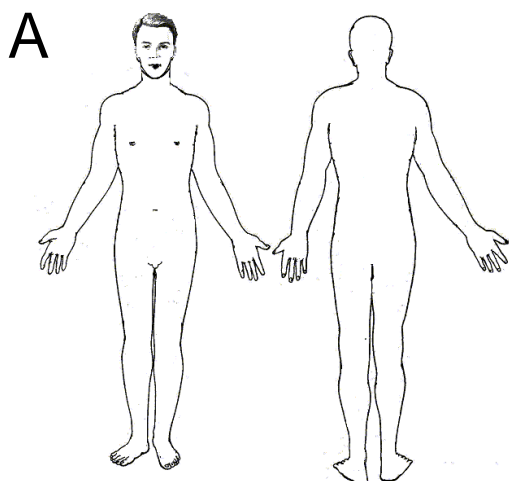
##### EVOLUÇÃO DAS LESÕES

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.



Local (usar número colocado no esquema acima)	Tempo após lesão primária
1	
2	
3	
4	

**DIAGNÓSTICO DEFINITIVO**

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

Pênfigo Vulgar ( ) Pênfigo Foliáceo ( ).

Local do diagnóstico - Instituição: \_\_\_\_\_ 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.  
     Volume em EDTA para DNA \_\_\_\_\_ml, para células \_\_\_\_\_ml.  
     Volume em ativador de coagulação (para soro) \_\_\_\_\_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

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 pêfigo? (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			