

NOEMI FARAH PEREIRA

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS NA PATOGÊNESE DO  
PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO: ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO  
COM GENES DE CITOCINAS E MICROSSATÉLITES DO  
COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza Petzl-Erler

CURITIBA

2004

**Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas**

Pereira, Noemi Farah

Investigação de fatores genéticos na patogênese do pênfigo foliáceo endêmico: análise de associação com genes de citocinas e microssatélites do complexo principal de histocompatibilidade./  
Noemi Farah Pereira. – Curitiba, 2004.

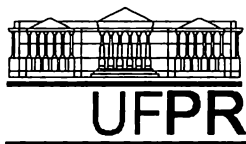
xv, 132 : il. ; 30cm.

Orientadora: Maria Luiza Petzl-Erler

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor de Ciências Biológicas.

1. Genética 2. Pênfigo foliáceo endêmico 3. Polimorfismo (Genética) 4. Citocinas I. Título II. Petzl-Erler, Maria Luiza III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.

CDD(20ed.) 575.1



Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**  
Programa de Pós-Graduação em Genética

## P A R E C E R

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado, a que se submeteu **NOEMI FARAH PEREIRA**, para fins de adquirir o título de Doutora em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A"

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 20 de fevereiro de 2004.

Banca Examinadora:



Profª. Dra. Maria Luiza Petzler-Erler  
Orientadora e Presidente

Prof. Dr. Jorge Kalil  
Membro

Prof. Dr. Diego Meyer  
Membro

Profª. Drª. Eleidi Alice Chauard-Freire-Maia  
Membro

Profª. Drª. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro  
Membro

Visto:

Profª. Drª. Marta Margarete Cestari  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Genética

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Petzl-Erler, reitero a minha admiração pela sua integridade e competência, qualidades estas que me influenciaram na solicitação de sua orientação por ocasião da minha dissertação de mestrado, e novamente para a realização do meu projeto de doutorado.

Aos pacientes, pelo seu desprendimento ao doar amostras de sangue e ao fornecer informações necessárias à realização deste trabalho.

A todos os professores que ministraram aulas no Curso de Pós-Graduação em Genética por terem contribuído para a minha formação.

À equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana, coordenado pela Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Petzl-Erler, pelo apoio, bem como pela averiguação e coletas de sangue, que viabilizaram a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora desta tese, Professor Dr. Jorge Kalil, Dr. Diogo Meyer, Professora Dr<sup>a</sup>. Eleidi Chautard Freire Maia e Professora Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria Ribeiro, pela leitura crítica e pelas sugestões relevantes que contribuíram para a finalização deste trabalho.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Eleidi Alice Chautard Freire Maia e ao Professor Dr. Iglénir João Cavalli, pelo apoio, bem como pelo acompanhamento deste trabalho através de leituras e sugestões relevantes.

À Dr<sup>a</sup>. Mary Carrington, do National Cancer Institute, NCI, em Frederick, EUA, e a toda a sua equipe, pelo apoio e compreensão que possibilitaram a realização da análise dos microssatélites do Complexo Principal de Histocompatibilidade.

Ao Professor Dr. John A. Hansen, do Fred Hutchinson Cancer Research Center, em Seattle, EUA, pelo apoio e compreensão que viabilizaram a análise da variabilidade dos genes das citocinas.

Ao Professor Dr. Ricardo Pasquini, pela confiança que sempre depositou com respeito às minhas atividades profissionais e pelo apoio e incentivo à minha formação científica.

Ao Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR, por apoiar o meu afastamento temporário para que eu pudesse realizar a parte experimental deste trabalho.

A todos os meus colegas do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas, pelo apoio e por terem realizado parte das minhas funções para que eu pudesse concluir o Curso de Pós-Graduação.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Felicitas Niedfeld de Rodriguez, pelo apoio e por ter assumido a Chefia do Laboratório de Imunogenética durante as minhas ausências.

À Telma Stresser, da biblioteca de Ciências Biológicas da UFPR, pela solicitude com que prestou informações sempre que estas se fizeram necessárias.

Ao Dr. Alfredo Marquardt Filho, do Hospital Adventista do Pênfigo, em Campo Grande, MS, por viabilizar as coletas de sangue dos pacientes com pênfigo foliáceo endêmico e franquear as informações clínicas necessárias à realização deste trabalho.

Ao Dr. Christian Macagnan Probst, pela elaboração do programa CONVERT que facilitou a realização da análise estatística deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao National Institute of Health (NIH, EUA) pelo apoio financeiro.

Agradeço e dedico este trabalho

ao meu companheiro Luso Mario

aos meus pais Suria e Antônio Carlos

ao Dr. Eurípides Ferreira

e ao Dr. Dennis Bernard Amos (*in memoriam*)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DO PÊNFIGO .....	1
1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EVOLUÇÃO E TRATAMENTO DO PFE .....	3
1.3 EPIDEMIOLOGIA DO PFE .....	4
1.4 FATORES GENÉTICOS DE SUSCETIBILIDADE / PROTEÇÃO AO PFE....	5
1.5 IMUNOPATOGÊNESE DO PÊNFIGO .....	7
1.6 CITOCINAS .....	10
1.6.1 Citocinas e o Paradigma Th1 / Th2 nas Doenças Auto-Imunes.....	10
1.6.2 Participação das Citocinas na Patogênese do Pênfigo .....	12
1.6.3 Polimorfismo dos Genes das Citocinas nas Doenças Auto-Imunes.....	13
1.6.4 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ) .....	14
1.6.5 Complexo da Interleucina 1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-1Ra).....	18
1.6.6 Interleucina 6 (IL-6) .....	21
1.6.7 Interleucina 4 (IL-4) e Receptor da Interleucina 4 (IL-4R $\alpha$ ).....	24
1.6.8 Interleucina 10 (IL-10) .....	27
1.7 MARCADORES MICROSSATÉLITES NA IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE SUSCETIBILIDADE A DOENÇAS.....	31

<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1	CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA .....	36
3.2	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	38
3.3	TIPIFICAÇÃO DE SNP PELO MÉTODO DA PCR-RFLP.....	38
3.3.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	38
3.3.2	Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) .....	39
3.4	TIPIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>IL6</i> -174 PELO MÉTODO DA PCR-SSO .....	44
3.5	SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO REGULADORA DO GENE <i>TNF</i> .....	44
3.5.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	44
3.5.2	Purificação com Fosfatase Alcalina e Exonuclease I .....	45
3.5.3	Reação de Seqüenciamento.....	46
3.5.4	Purificação com Etanol.....	46
3.5.5	Eletroforese em Seqüenciador ABI PRISM® 3700.....	47
3.6	TIPIFICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES POR SISTEMA DE ELETROFORESE DE DNA USANDO OLIGONUCLEOTÍDEOS MARCADOS COM FLUORÓFOROS .....	47
3.6.1	Reação em Cadeia da Polimerase .....	48
3.6.2	Preparo das Amostras para Eletroforese em Gel Desnaturante .....	50
3.6.3	Eletroforese em Gel Desnaturante.....	50
3.6.4	Análise e Interpretação dos Resultados .....	51
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	54
4.1	ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP) NOS GENES DAS INTERLEUCINAS.....	54

4.1.1	Análise de Polimorfismos do Complexo Gênico <i>IL1</i> .....	54
4.1.2	Análise da Posição -590 do Gene <i>IL4</i> .....	57
4.1.3	Análise do Nucleotídeo 148 do Gene <i>IL4R</i> .....	59
4.1.4	Análise da Posição -174 do Gene <i>IL6</i> .....	59
4.1.5	Análise das Posições -592 e -1082 do Gene <i>IL10</i> .....	62
4.2	INVESTIGAÇÃO DE NOVOS POLIMORFISMOS NA REGIÃO REGULADORA DO GENE <i>TNF</i> POR MEIO DE SEQÜENCIAMENTO DO DNA.....	66
4.3	ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES DO CPH .....	68
4.4	ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS DOS GENES <i>HLA-DRB1</i> , <i>HLA-DQA1</i> , <i>HLA-DQB1</i> E DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>G51152</i> .....	78
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	86
5.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	86
5.2	GENE <i>TNF</i> E COMPLEXO GÊNICO DA <i>IL1</i> .....	87
5.3	GENE <i>IL10</i> .....	90
5.4	GENES <i>IL4</i> E <i>IL4R</i> .....	92
5.5	GENE <i>IL6</i> .....	95
5.6	MODELO DE PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO .....	101
5.7	MICROSSATÉLITES DO CPH E PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO.....	102
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	104
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	106

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FORMAS DE MANIFESTAÇÃO DO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO .....	1
FIGURA 2 - LESÕES EPIDÉRMICAS DO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO .....	2
FIGURA 3 - MAPA DO CPH MOSTRANDO ALGUNS GENES DAS REGIÕES DE CLASSES I, II E III E A LOCALIZAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES .....	48

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUÇÃO DA PCR PARA GENOTIPIFICAÇÃO DE SNP DOS GENES <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> , <i>IL4</i> , <i>IL4R</i> , <i>IL6</i> E <i>IL10</i> PELO MÉTODO DE PCR-RFLP.....	40
TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES POLIMÓRFICAS DOS GENES DAS INTERLEUCINAS PARA ANÁLISE POR RFLP .....	41
TABELA 3 - PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DOS GENES <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> , <i>IL4</i> , <i>IL4R</i> , <i>IL6</i> E <i>IL10</i> POR MEIO DE RFLP.....	42
TABELA 4 - ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO E FRAGMENTOS GERADOS APÓS DIGESTÃO DOS PRODUTOS DA PCR DOS GENES <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> , <i>IL4</i> , <i>IL4R</i> , <i>IL6</i> E <i>IL10</i> .....	43
TABELA 5 - SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TIPIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES LOCALIZADOS NA REGIÃO DO CPH .....	49
TABELA 6 - QUANTIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES, NO TUBO DE REAÇÃO, PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE MICROSSATÉLITES POR MEIO DA PCR.....	49
TABELA 7- INFORMAÇÕES SOBRE O TAMANHO DOS ALELOS E OS FLUORÓFOROS UTILIZADOS NA MARCAÇÃO DOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES DO CPH .....	51
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES CAUCASÓIDES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DE <i>IL1A</i> -889, <i>IL1B</i> -511, <i>IL1B</i> +3954 E <i>IL1RN</i> nt 9261.....	55
TABELA 9 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES CAUCASÓIDES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DO COMPLEXO GÊNICO <i>IL1</i> ( <i>IL1A</i> -889_ <i>IL1B</i> -511_ <i>IL1B</i> +3954_ <i>IL1RN</i> nt 9261).....	56
TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO POLIMORFISMO -590 (C → T) DO GENE <i>IL4</i> .....	58

TABELA 11 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO POLIMORFISMO DO NUCLEOTÍDEO 148 (A → G) DO GENE <i>IL4R</i> .....	60
TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO POLIMORFISMO - 174 (G → C) DO GENE <i>IL6</i> .....	61
TABELA 13 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DOS POLIMORFISMOS -592 (C → A) E -1082 (A → G) DO GENE <i>IL10</i> .....	63
TABELA 14 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DO GENE <i>IL10</i> .....	65
TABELA 15 - SUBSTITUIÇÕES DE PONTO IDENTIFICADAS NA REGIÃO REGULADORA DO GENE <i>TNF</i> POR MEIO DE SEQÜENCIAMENTO DO DNA DE CÉLULAS DE REFERÊNCIA DOS WORKSHOPS INTERNACIONAIS DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	67
TABELA 16 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>D6S265</i> .....	69
TABELA 17 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>D6S273</i> .....	70
TABELA 18 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>D6S276</i> .....	71
TABELA 19 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>D6S291</i> .....	72
TABELA 20 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>G51152</i> .....	73

TABELA 21 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>MIB</i> .....	74
TABELA 22 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>MOGČA</i> .....	75
TABELA 23 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>RING3CA</i> .....	76
TABELA 24 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE <i>TAPICA</i> .....	77
TABELA 25 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS LOCOS <i>G51152</i> , <i>DRB1</i> , <i>DQA1</i> E <i>DQB1</i> ENTRE PACIENTES COM PFE E CONTROLES.....	79
TABELA 26 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS LOCOS <i>G51152</i> , <i>DQA1</i> E <i>DQB1</i> ENTRE PACIENTES COM PFE E CONTROLES .....	82
TABELA 27 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS LOCOS <i>G51152</i> E <i>DRB1</i> ENTRE PACIENTES COM PFE E CONTROLES.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
BSF-2	<i>B cell Stimulatory Factor 2</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CSIF	<i>Cytokine Synthesis Inhibitor Factor</i>
dsg-1	desmogleína 1
<i>DSG1</i>	Gene da desmogleína 1
dsg-3	desmogleína 3
EC	Ectodómio
Fab	<i>Fragment of antigen binding</i>
FS	Fogo selvagem
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
H-W	Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
IFN $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
<i>IL10R1</i>	Gene do receptor 1 da interleucina 10
<i>IL10R2</i>	Gene do receptor 2 da interleucina 10
IL-10R $\alpha$	Receptor alfa da interleucina 10
IL-10R $\beta$	Receptor beta da interleucina 10
IL-13R $\alpha$ 1	Receptor alfa 1 da interleucina 13
IL-1Ra	Antagonista do receptor da interleucina 1
IL-1RI	Receptor I da interleucina 1
IL1-RI-AcP	Proteína acessória do receptor 1 da interleucina 1
IL-1RII	Receptor II da interleucina 1
<i>IL1RN</i>	Gene do antagonista do receptor da interleucina 1
IL-2R	Receptor da interleucina 2
IL-2R $\gamma$	Receptor gama da interleucina 2
<i>IL4R</i>	Gene do receptor alfa da interleucina 4
IL-4R $\alpha$	Receptor alfa da interleucina 4
IL-6R $\alpha$	Receptor alfa da interleucina 6
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
JAK	<i>Janus family tyrosine kinase</i>

LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
LTA	Linfotoxina $\alpha$
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NF-IL6	<i>Nuclear Factor of Interleukin 6</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OCT-1	<i>Octameric-1</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PF	Pênfigo Foliáceo
PFE	Pênfigo Foliáceo Endêmico
PV	Pênfigo vulgar
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOCS1	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 1</i>
SSO	<i>Sequence Specific Oligonucleotide</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TDT	<i>Transmission Disequilibrium Test</i>
TGF $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th	<i>T helper</i>
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TNF-R1	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
TNF-R2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i>
TNFRSF	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family</i>
TNFRSF1A	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family 1A</i>
TNFRSF1B	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family 1B</i>
TNFSF	<i>Tumor Necrosis Factor Super Family</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
Tr	<i>T regulatory</i>
TyK2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
WHI	Workshop Internacional de Histocompatibilidade

## RESUMO

O pênfigo foliáceo endêmico (PFE) é uma doença auto-imune de etiologia complexa, caracterizada pela presença de auto-anticorpos cujo alvo é a desmogleína 1 (dsg-1), os quais induzem a perda de adesão entre os queratinócitos (acantólise). O mecanismo subjacente ao processo acantolítico não é compreendido. A participação de mecanismos celulares não está elucidada, embora células T anti-dsg-1 tenham sido encontradas em sangue periférico de pacientes com PFE. As citocinas que são expressas pelas células T CD4+ presentes no sangue e nas lesões epidérmicas mostram predominância de perfil tipo 2. Características epidemiológicas do PFE sugerem que a exposição a fatores ambientais desencadeie as manifestações clínicas da doença em indivíduos geneticamente suscetíveis. Certas variantes dos genes *HLA-DRB1*, *DQA1* e *DQB1* são os únicos fatores genéticos já estabelecidos como moduladores da suscetibilidade e proteção ao PFE. Este estudo teve como objetivo pesquisar outros fatores genéticos subjacentes à patogênese do PFE. Foram investigadas outras regiões do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) que pudessem conter genes, além dos genes *HLA*, envolvidos na fisiopatologia desta doença; foi pesquisada também a influência das variantes de genes das citocinas, uma vez que seus polimorfismos podem afetar o nível de produção destas moléculas imunomoduladoras. A amostra incluiu 168 pacientes com PFE e 189 controles, sendo constituída em sua maioria de caucasóides e negróides, e em menor proporção de índios e mestiços de índios com caucasóides. A investigação de genes de suscetibilidade no CPH foi baseada em um estudo de associação caso-controle, utilizando microssatélites. Os alelos foram tipificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores loco-específicos, marcados com fluoróforos. Os produtos da PCR foram diferenciados por tamanho em analisador de DNA. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre o PFE e as variantes dos microssatélites *D6S265*, *D6S273*, *D6S276*, *D6S291*, *MIB*, *MOGCA*, *RING3CA* e *TAPICA*; resultado esse que permite excluir como candidatos os genes próximos a esses marcadores. Com respeito ao microssatélite *G51152*, centromérico ao loco *HLA-DQB1*, foram identificadas associações negativas com os alelos \*215 (OR = 0,34), \*217 (OR = 0,27) e \*223 (OR = 0,39) e associação positiva com o alelo \*227 (OR = 6,00). Este resultado confirma associações entre o PFE e variantes das sub-regiões DR e DQ, reveladas em estudos anteriores. O efeito da variabilidade dos genes das citocinas foi investigado por um estudo de associação caso-controle, e as variantes, tipificadas por PCR-RFLP. Nenhuma associação foi observada com as variantes de *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4R* e *IL10*. Nos negróides, houve uma associação negativa fraca com o haplótipo -1082\_G -592 C do gene *IL10* (OR = 0,49). Em relação ao polimorfismo -590 do gene *IL4*, foi encontrada uma associação positiva com o genótipo T/T (OR = 2,71) e outra negativa com a variante C (OR = 0,37). Embora os resultados indiquem uma influência das variantes de *IL4* -590 na patogênese do PFE, sugerimos que o significado destas associações fracas seja esclarecido em amostra maior. Associações com as variantes de *IL6* -174 sugerem um efeito protetor do genótipo C/C (OR = 0,13), enquanto o alelo G parece ser um fator de suscetibilidade (OR = 7,66) ao PFE. A nossa hipótese é que o aumento da expressão da IL-6, influenciado pelo alelo -174 G, favoreça o espalhamento de epítomos que resulta na produção dos auto-anticorpos patogênicos, além de exacerbar as lesões epidérmicas pela indução de mediadores inflamatórios e de contribuir na diferenciação e manutenção dos clones T e B auto-reativos específicos para a dsg-1. Novas mutações de ponto foram identificadas no gene *TNF*, nas posições -1491, -1391, -1226 e -1380, pelo sequenciamento do DNA de 38 células de referência dos Workshops Internacionais de Histocompatibilidade. Estas novas variantes não foram investigadas para possíveis associações com PFE devido às suas frequências muito baixas.

## ABSTRACT

Endemic pemphigus foliaceus (EPF) is an autoimmune disease of complex etiology characterized by the presence of antibodies against desmoglein 1 (dsg-1). The presence of these autoantibodies leads to the loss of adhesion among keratinocytes (acantholysis). The mechanism underlying the acantholytic process has not been understood, yet. Although autoreactive T cells specific to dsg-1 have been found in peripheral blood of patients with EPF, the role played by cellular mediated responses has not been elucidated. CD4+ T cells from the peripheral blood as well as from the epidermal lesions express predominantly a type 2 cytokine profile. Epidemiological features suggest that exposure to environmental antigens triggers the disease in genetically susceptible individuals. Certain variants of *HLA-DRB1*, *DQA1* and *DQB1* genes have been the only genetic factors found to modulate susceptibility and resistance to EPF, so far. The aims of this study were to identify other genetic factors underlying the pathogenesis of EPF. Other regions of the Major Histocompatibility Complex (MHC) were investigated for the presence of genes, other than HLA genes, which could be involved in the pathophysiology of EPF. The influence of cytokine gene variants was also investigated due to the fact that their polymorphisms may affect the levels of production of these immunomodulatory molecules. The sample included 168 patients with EPF and 189 controls and was comprised mostly of Caucasoids and Mulattos with a small proportion of Amerindians and Mestizos (Amerindian x Caucasoid). The approach taken for investigating MHC susceptibility genes was an association study in a case-control design using microsatellites. Alleles were typed by polymerase chain reaction (PCR) utilizing locus-specific fluorescent-labeled primers. Amplified products were distinguished by size using a DNA analyzer. No significant associations were found between EPF and allelic variants from microsatellites *D6S265*, *D6S273*, *D6S276*, *D6S291*, *MIB*, *MOGCA*, *RING3CA* and *TAP1CA*. This result allows the exclusion of the genes located near to these markers as candidates. With respect to microsatellite *G51152*, centromeric to *HLA-DQB1* locus, negative associations were found with alleles \*215 (OR = 0.34), \*217 (OR = 0.27) and \*223 (OR = 0.39) in addition to a positive association with allele \*227 (OR = 6.00). These results confirm associations of EPF with variants of the DR and DQ sub-regions that have been revealed in previous studies. The effect of cytokine genes variability was also investigated by a case-control association study and the alleles were typed by PCR-RFLP. No associations were found with variants of *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4R* and *IL10*. In Mulattos, there was a negative weak association with haplotype -1082 G\_-592 C (OR = 0.49) of the *IL10* gene. With regard to the polymorphism -590 of the *IL4* gene, a positive association with T/T genotype (OR = 2.71) and a negative association with the C variant (OR = 0.37) were found. Although these results indicate an influence of *IL4* -590 variants in the pathogenesis of EPF, we suggest that the meaning of these weak associations be elucidated in a larger sample. Associations with the *IL6* -174 variants suggest that the C/C genotype has a protective effect (OR = 0.13) while the G allele seems to confer susceptibility (OR = 7.66) to EPF. We hypothesize that over expression of IL-6, influenced by allele -174 G, favors epitope spreading that leads to production of pathogenic autoantibodies. Furthermore, it causes exacerbation of epidermal lesions by inducing other inflammatory mediators and contributes to differentiation and sustaining of the growth of autoreactive T and B cell clones specific to dsg-1. Finally, new point mutations were found in the *TNF* gene at positions -1491, -1391, -1226 and -1380 by sequencing the DNA of 38 International Histocompatibility Workshop reference cells. Due to the low frequency of the new variants, they were not investigated for possible associations with EPF.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DO PÊNFIGO

O pênfigo foliáceo (PF) e o pênfigo vulgar (PV) são os principais tipos de um grupo de doenças auto-imunes crônicas tecido-específicas cuja principal característica histológica é a presença de bolhas acantolíticas e erosões na epiderme e ou nas mucosas (figura 1). A formação destas bolhas, processo denominado acantólise, tem como base molecular uma desorganização na estrutura dos desmossomos com conseqüente perda de adesão entre os queratinócitos epidérmicos ou entre as células epiteliais das mucosas. Além destes tipos clássicos de pênfigo (PF e PV), existem variantes clínicas mais raras, tais como: o pênfigo herpetiforme, o pênfigo IgA e o paraneoplásico, dentre outras dermatoses bolhosas (AMAGAI, 1999; ROBINSON et al., 1999; VERDOLINI e CERIO, 2003).



FIGURA 1 - FORMAS DE MANIFESTAÇÃO DO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

Fonte: Diógenes, M.J. et al. Atlas de Dermatologia Tropical. Fortaleza: INOVA, 1997.

Outra característica destas doenças é a presença de auto-anticorpos contra os desmossomos, observação feita inicialmente por JONES et al. (1984). Posteriormente, descobriu-se que estes anticorpos eram dirigidos contra epítomos das proteínas glicosiladas que constituem os desmossomos (figura 2), a desmogleína 1 (dsg-1) no PF e a desmogleína 3 (dsg-3) no PV (figura 2) (EYRE e STANLEY, 1988). Estas proteínas pertencem à

família das caderinas, que é constituída de moléculas de adesão celular (KOCH et al., 1990), e os genes que as codificam estão localizados no braço longo do cromossomo 18 em 18q12.1 (ARNEMANN et al., 1991; 1992).

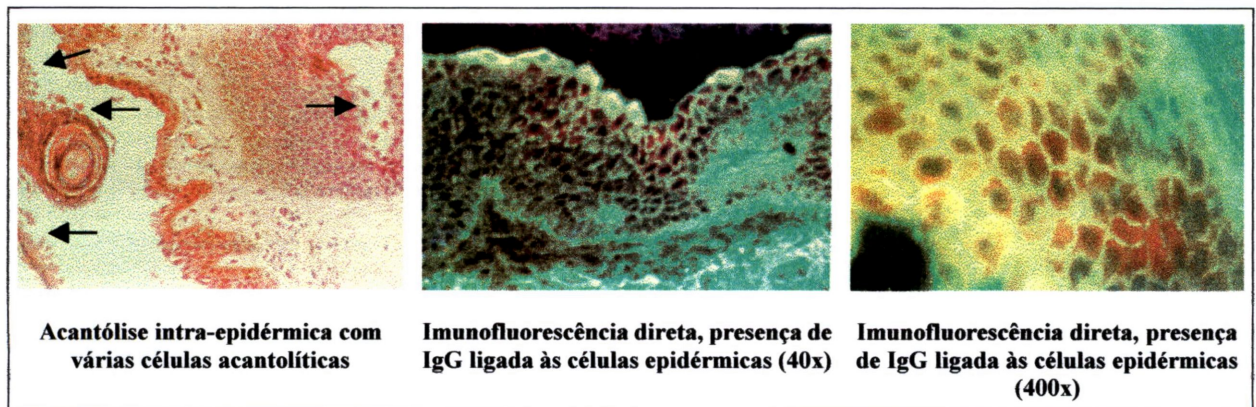


FIGURA 2 - LESÕES EPIDÉRMICAS DO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

Fonte: Diógenes, M.J. et al. Atlas de Dermatologia Tropical. Fortaleza: INOVA, 1997.

Embora o desmossomo seja o alvo da resposta inflamatória e da auto-imunidade em ambos tipos de pênfigo, as lesões epidérmicas ocorrem na camada suprabasal no PV e na subcórnea no PF (LEVER e SCHAUMBURG-LEVER, 1990). O fenótipo clínico dos tipos clássicos de pênfigo parece ser determinado pelos seus perfis de auto-anticorpos. Os pacientes com PF produzem anticorpos contra a dsg-1 e apresentam somente manifestações cutâneas de extensões variadas, enquanto os pacientes com PV podem apresentar apenas anticorpos anti-dsg-3 ou ambos os tipos (anti-dsg-1 e anti-desg-3). No primeiro caso, observam-se principalmente lesões mucosas com envolvimento cutâneo bastante limitado e, no segundo, ocorre manifestação plena de lesões mucosas e epidérmicas (AMAGAI, 1999; AMAGAI et al., 1999). Essas diferenças fenotípicas podem ser devido às diferenças de expressão das dsg-1 e dsg-3, sendo a primeira detectada na camada superior ou subcórnea e a segunda, na camada suprabasilar (SHIMIZU et al., 1995).

Existem dois tipos de pênfigo foliáceo, o esporádico que ocorre em diversas partes do mundo e o endêmico, denominado Fogo Selvagem (FS), cuja incidência é restrita a certas regiões do Brasil e de alguns países latino-americanos (DIAZ et al., 1989). Apesar de o pênfigo foliáceo endêmico (PFE) apresentar características histológicas, clínicas e imunológicas muito similares ao tipo esporádico, diferencia-se deste último pela peculiaridade de sua epidemiologia (SAMPAIO et al., 1994).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EVOLUÇÃO E TRATAMENTO DO PFE

As lesões cutâneas primárias do PFE são bolhas superficiais que se rompem facilmente deixando áreas desnudas. Na maioria dos pacientes, a doença evolui gradualmente ao longo de várias semanas ou meses, e raramente se observam casos agudos e fulminantes (HANS-FILHO et al., 1999). O nome popular Fogo Selvagem (FS) surgiu em decorrência do aspecto de queimadura das lesões sobre a pele exposta ao sol associado à sensação de dor e queimação (SAMPAIO et al., 1994).

A forma crônica do FS apresenta lesões nas áreas seborréicas da face e do tronco que podem permanecer inalteradas por meses ou anos. Durante o curso da doença, alguns pacientes apresentam remissão espontânea ou após o tratamento. Outros, porém, evoluem para uma forma generalizada com múltiplas lesões que se estendem do tronco às extremidades. Esta forma engloba três síndromes que diferem quanto às características clínicas: na primeira ou bolho-esfoliativa, que é a mais grave e agressiva, predominam lesões bolhosas e algumas lesões erosivas crônicas que refletem uma dermatite esfoliativa. A segunda, um típico eritoderma esfoliativo, mostra erosões superficiais acompanhadas de crostas e de exsudação sérica; e a terceira apresenta placas queratóticas e lesões nodulares similares àquelas da forma localizada da doença (HANS-FILHO et al., 1999).

Esta doença, na ausência de terapia, pode ser letal devido à perda da pele e aos riscos conseqüentes de infecções e septicemia. Os tratamentos convencionais para o PFE têm sido baseados em glicocorticóides e adjuvantes que incluem antibióticos, anti-maláricos e várias drogas imunossupressoras (HUILGOL e BLACK, 1995). A adsorção dos anticorpos anti-dsg1, por meio de polivinil-álcool conjugado com triptofano, mostrou-se uma medida terapêutica adjuvante eficiente por possibilitar a redução das quantidades de glicocorticóides administradas (LÜFTL, et al., 2003). Apesar de estas medidas terapêuticas melhorarem o prognóstico, elas comprometem a qualidade de vida dos indivíduos afetados pelos efeitos colaterais adversos destas drogas. Pacientes que não respondem a estes tratamentos ou que apresentam efeitos colaterais graves têm sido submetidos a outras modalidades, por exemplo, a administração de imunoglobulina endovenosa (AHMED e SAMI, 2002; SAMI et al., 2002). A terapia com anticorpos anti-idiotípicos, que no modelo murino demonstrou a neutralização *in vivo* dos efeitos patogênicos da IgG do PF, representa uma possibilidade terapêutica futura que poderá suprimir ou aliviar as manifestações clínicas do PFE (ALVARADO-FLORES et al., 2001).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA DO PFE

No Brasil já houve áreas endêmicas importantes em vários estados brasileiros, dentre os quais se incluem certas regiões de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Muitas delas apresentaram um período de ascensão que foi coincidente com a sua fase de desmatamento e colonização, seguida da diminuição ou do desaparecimento da doença à medida que foram sendo urbanizadas. Atualmente a incidência do PFE está restrita a determinadas áreas, principalmente na Região Centro-Oeste, que já constituíram grandes focos endêmicos (AUAD, 1972; DIAZ et al., 1989; EMPINOTTI et al., 1990; HANS-FILHO et al., 1996; CAMPBELL et al., 2001; CHIOSSI e ROSELINO, 2001).

A ocorrência da doença é mais freqüente em adultos jovens e crianças, independente do sexo ou etnia, ao contrário da forma esporádica cuja ocorrência geralmente se dá em indivíduos de meia idade ou mais velhos. Os pacientes, em sua maioria, trabalham na lavoura ou exercem outras atividades relacionadas ao ambiente rural, e mais raramente a doença se manifesta em indivíduos que não tiveram contato com este meio.

Estudos epidemiológicos sugerem que a forma endêmica do pênfigo foliáceo é desencadeada por um ou mais fatores ambientais de distribuição geográfica limitada. WARREN et al. (2000) constataram que a prevalência de anticorpos contra a dsG-1 é elevada em indivíduos saudáveis e residentes da área endêmica e decai à medida que aumenta a distância desta região. Outras investigações analisaram vários possíveis fatores de risco; porém, a picada do inseto *Simulium nigritanum* (mosca negra) foi o único fator ambiental que apresentou uma correlação perceptível com esta doença (LOMBARDI et al., 1992; EATON et al., 1998). De fato, muitos pacientes moram próximos a rios ou riachos, que constituem hábitat para insetos da família *Simuliidae*.

Esses resultados fortalecem a hipótese levantada por alguns pesquisadores de que este inseto é o transmissor de um antígeno desencadeador da doença. O estímulo antigênico crônico seria procedente de sua saliva ou de um agente infeccioso que o utiliza como vetor, e a resposta auto-imune seria explicada pela reatividade cruzada com a desmogleína-1. A indução de auto-reatividade por mimetismo molecular já foi demonstrada em outras doenças como a febre reumática, na qual a resposta auto-imune é iniciada pela infecção com estreptococos devido à reatividade cruzada entre antígenos estreptocócicos e a miosina cardíaca (GUILHERME et al., 1995).

#### 1.4 FATORES GENÉTICOS DE SUSCETIBILIDADE / PROTEÇÃO AO PFE

O PFE, de forma semelhante à da grande maioria das doenças auto-imunes, é decorrente da ação conjunta de múltiplos genes que podem ser polialélicos e / ou polimórficos. Os alelos destes genes podem estar presentes tanto em pessoas saudáveis como nas afetadas pela doença, pois individualmente são compatíveis com uma função imune normal. Alguns alelos podem conferir suscetibilidade e outros, a resistência ao estabelecimento e ou à modulação da doença, embora cada gene determine seu próprio nível de risco ou proteção. O efeito final do conjunto de genes presentes num indivíduo, em concerto com os fatores ambientais, será determinante no estabelecimento da auto-imunidade patogênica. Considerando que estas doenças resultam de desequilíbrios na resposta imune, encontramos vários genes candidatos à predisposição das mesmas. Dentre eles incluem-se os que codificam os receptores e os co-receptores de antígenos, as moléculas co-estimuladoras, as moléculas envolvidas nas vias que promovem ou inibem a apoptose, as citocinas e os fatores envolvidos nas vias de sinalização do antígeno ou na sinalização das citocinas.

As primeiras evidências do envolvimento de fatores genéticos no PFE foram sugeridas pela agregação familiar e pela alta proporção de indivíduos residentes na área endêmica que não desenvolvem a doença. Estudos com os genes do complexo *HLA* (*Human Leukocyte Antigens*) ou seus produtos mostraram associações com alelos de classe II. A suscetibilidade ao PFE, em uma amostra de brasileiros de origem predominantemente europeia, foi inicialmente associada às especificidades sorológicas HLA-DR1 e DR4, e a resistência aos haplótipos DR7-DQw2 e DR3-DQw2 (PETZL-ERLER e SANTAMARIA., 1989). Análise posterior, em mestiços brasileiros, corroborou as associações positivas com DR1 (*DRB1\*0102*) e associação negativa com DQw2 (MORAES et al., 1991), e sugeriu associação positiva também com DR16. Análises de índios brasileiros, Xavantes e Terenas, demonstraram associações positivas com *DRB1\*0404* e *1402/06* (CERNA et al., 1993; MORAES et al., 1997). Segundo estes últimos autores, os produtos alélicos associados positivamente ao PFE, nos diferentes grupos étnicos, compartilham a mesma seqüência de aminoácidos nas posições 67 a 74 da cadeia de *DRB1*, levando-os a sugerir que a suscetibilidade seria conferida por um epítipo comum.

Nessa sucessão de estudos, a análise de uma população brasileira, constituída principalmente de caucasóides e de mulatos, e em menor proporção por índios e alguns

mestiços de índios com caucasóides, possibilitou uma melhor definição das associações com variantes do gene *DRB1* (PAVONI et al., 2003). Os alelos *DRB1\*0101*, *0102*, *0103*, *0404*, *0406*, *0410*, *1406* e *1601* estão associados de forma positiva [OR (*odds ratio*) = 1,83, 10,36, 5,41, 4,58, 35,85, 9,62, 4,04 e 2,87, respectivamente], enquanto *DRB1\*0301*, *0701*, *0801*, *1101*, *1104* e *1402* mostram associação negativa com a doença (OR = 0,23, 0,09, 0,07, 0,05, 0,15 e 0,09, respectivamente). Os mesmos autores sugeriram que os alelos protetores são semidominantes sobre os de suscetibilidade e dominantes em relação aos alelos neutros, enquanto os alelos de suscetibilidade são semidominantes com relação aos alelos neutros.

Mais recentemente, foram demonstradas por ROXO (2003) associações positivas com os alelos *DQA1\*0101* (OR = 4,72) e *DQB1\*0501* (OR = 5,61), assim como associações negativas com *DQA1\*0103*, *\*0201* e *\*0501* (OR = 0,14, 0,07, 0,31, respectivamente), e *DQB1\*02* e *\*0301* (OR = 0,12, e 0,46, respectivamente); e a análise estratificada revelou associações primárias com *DQB1\*02*, *DRB1\*1101* e *DRB1\*0102*. A autora conclui que tanto os alelos *HLA-DQ* de suscetibilidade quanto os de resistência têm efeito dominante sobre os neutros, e que os alelos de suscetibilidade e de resistência apresentam uma relação de semidominância em ambos os locos *DQA1* e *DQB1*. Foram analisadas também posições dos genes da linfotoxina  $\alpha$  (*LTA* 249, 365 e 720), da proteína de apoptose (*FAS* -1377) e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (*TNF* -863 e -308), mas não foi evidenciado um efeito de seus alelos seja na predisposição, seja na proteção ao PFE (ROXO et al., 2003). Com respeito à posição -238 do gene *TNF*, foi verificada apenas uma associação negativa discreta com o alelo *\*238A* (OR = 0,45; *P* = 0,0470).

Polimorfismos do gene que codifica a *dsg-1*, a molécula alvo dos auto-anticorpos patogênicos do PFE, também foram investigados. A análise da posição 809, que apresenta uma transição de timina para citosina, mostrou uma associação positiva da variante *DSG1\*809 C* em caucasóides (MARTEL et al., 2001). Os autores justificam que a associação com este alelo, resultante de uma mutação silenciosa, provavelmente se deve ao desequilíbrio de ligação entre este e um polimorfismo localizado noutra região da sequência codificadora ou reguladora de *DSG1*. Entretanto, num estudo de uma amostra brasileira de maior tamanho não foi encontrada qualquer associação com as variantes das posições 809 e 1660 do gene *DSG1* (MALHEIROS et al., 2003).

## 1.5 IMUNOPATOGÊNESE DO PÊNFIGO

Uma das características imunológicas marcantes do PFE é a presença de auto-anticorpos patogênicos contra a *dsg-1*, que resulta em acantólise na camada epidérmica mais superficial constituída de células granulares. A patogenicidade destes anticorpos foi demonstrada mediante sua transferência passiva em modelo murino. Tanto os anticorpos do PFE quanto os do PV reproduziram nos camundongos os aspectos clínicos, histológicos e imunológicos das respectivas doenças humanas (ANHALT et al., 1982; ROSCOE et al., 1985; FUTAMURA et al., 1989; ROCK et al., 1989; AMAGAI et al., 1992; AMAGAI et al., 1996). Experimentos de modelo ativo do PV foram realizados com sucesso em camundongos, mas ainda não foram relatados para o PFE (AMAGAI et al., 2000).

A transferência placentária de auto-anticorpos do PV causa doença neonatal em humanos (MONCADA et al., 1982; MERLOB et al., 1986), mas é bastante incomum no PFE, havendo apenas dois casos relatados (ROCHA-ALVAREZ et al., 1992; HIRSCH et al., 2003). Esta proteção no PF, segundo WU et al. (2000), é conferida pela presença concomitante das desmogleínas 1 e 3 na camada subcórnea dos recém-natos, onde a *dsg-3* deve assegurar a adesão celular mesmo na presença de anticorpos anti-*dsg1*.

Os auto-anticorpos do PFE, predominantemente da subclasse IgG4 (IgG = Imunoglobulina G), são encontrados tanto no soro dos pacientes quanto nas suas lesões epidérmicas nas quais estão ligados à superfície dos queratinócitos (ROCK et al., 1989; WARREN et al., 2003). O estabelecimento da doença é precedido por uma resposta prolongada de anticorpos séricos cujos títulos estão correlacionados à extensão e gravidade das manifestações clínicas (BEUTNER et al., 1968; WARREN et al., 2000). Apesar do predomínio da IgG4 no PF (ROCK et al., 1989; FRIEDMAN et al., 1995; HANS-FILHO et al., 1996; WARREN et al., 2000; 2003) e no PV (JONES et al., 1988; BHOL et al., 1995), na maioria dos pacientes IgG1 e / ou IgG2 são detectadas junto com a IgG4 e, mais raramente, o PF é mediado apenas por auto-anticorpos IgG1 (HERNANDEZ et al., 1997). Enquanto a IgG4 se mantém com títulos elevados durante todo o curso evolutivo do PFE, uma certa elevação dos títulos de IgG1 são detectados somente na fase inicial do estabelecimento ou da recaída da doença (ESPAÑA et al., 1997; WARREN et al., 2003). Entretanto, a patogenicidade dos auto-anticorpos parece não estar necessariamente associada com a subclasse, mas sim à sua especificidade (LI et al., 2002). Um estudo recente demonstra a presença de anticorpos dirigidos contra o quinto domínio externo da *dsg-1* no período pré-clínico de pacientes com

PFE, bem como em indivíduos saudáveis, e associa o estabelecimento das manifestações clínicas com o surgimento de anticorpos específicos para os dois primeiros domínios amino-terminais desta molécula alvo (LI et al., 2003).

Embora os experimentos de transferência passiva tenham mostrado os efeitos patogênicos das imunoglobulinas do pêfigo, o mecanismo exato da acantólise subsequente à ligação dos auto-anticorpos nas desmogleínas ainda não é compreendido. Dentre os mecanismos propostos, alguns incluem um efeito mais direto da ligação do auto-anticorpo à molécula alvo, que resulta no comprometimento da sua capacidade aderente, outros consideram a participação de proteases que podem estar envolvidas na degradação de moléculas de adesão (AMAGAI et al., 1992; KOCH et al., 1997; AOYAMA et al., 1999).

O efeito do ativador de plasminogênio na superfície dos queratinócitos foi investigado pela sua propriedade de promover a formação de enzimas proteolíticas como a plasmina. A administração sistêmica de inibidores da protease ativadora do plasminogênio resultou em bloqueio dos efeitos patogênicos das IgGs procedentes de pacientes com PF e também daqueles com PV (SPILLMAN et al., 1988; NAITO et al., 1989). Contrastando com este resultado, experimentos em camundongos com o gene ativador do plasminogênio nocauteado sugerem que o seu produto não é obrigatório para a indução da acantólise (MAHONEY et al., 1999). Estudos *in vitro* mostraram que os anticorpos contra a dsg-1 induzem vias de sinalização intracelular envolvidas na ativação de proteases (SEISHIMA et al., 1999). Estes resultados, apesar de contraditórios, sugerem que as proteases das células epidérmicas não são imprescindíveis, mas podem contribuir para a formação das bolhas acantolíticas.

O complemento, um sistema de defesa importante da epiderme, também foi investigado, porque os produtos resultantes de sua ativação podem mediar processos inflamatórios e lesões teciduais. Experimentos de transferência passiva mostraram que moléculas de IgG4 do PF ou seus fragmentos Fab e F(ab')<sub>2</sub> induzem a formação de bolhas epidérmicas, tanto em camundongos normais como naqueles portadores de deficiência de complemento (ESPAÑA et al., 1997). Embora estes resultados sugiram que nenhuma das vias de ativação do complemento é necessária para a indução da acantólise, eles não excluem sua possível contribuição. Depósitos do terceiro componente do complemento (C3) e de IgG foram observados nos espaços intercelulares de lesões epidérmicas do PFE (DE MESSIAS et al., 1988) e também do PF esporádico (HERNANDEZ et al., 1997). A

ativação das vias clássica e alternativa do complemento foi sugerida pela detecção de níveis elevados de fragmentos dos componentes C4d e Ba no plasma de pacientes com PFE, sendo que a ativação deste sistema mostrou-se mais intensa durante a fase mais ativa da doença (DE MESSIAS et al., 1989). A hipótese da participação do complemento nas lesões do pêfigo é reforçada pela observação de que ele potencializa a perda de adesão dos queratinócitos (JORDON, 1980; KAWANA et al., 1986; 1988). Outro fato a ser considerado é a presença da IgG1, uma classe de anticorpo que fixa complemento, na fase inicial da doença ou da sua recidiva, uma vez que os produtos liberados durante a cascata do complemento atuam como mediadores inflamatórios e fatores quimiotáticos de neutrófilos. De fato, infiltrados inflamatórios com a presença de neutrófilos, junto a outros tipos celulares, são observados nas lesões epidérmicas do pêfigo (LEVER e SCHAUMBURG-LEVER, 1990; CAPRONI et al., 2001).

A participação da auto-imunidade celular na patogênese do pêfigo ainda não é bem compreendida, e os mecanismos moleculares de reconhecimento dos autoantígenos pelas células T estão sendo investigados. Células T de memória (CD3+, CD4+, CD45RO, TCR $\alpha\beta$ ), que proliferam especificamente em resposta ao domínio extracelular da dsg-1 e da dsg-3 foram identificadas em sangue periférico de pacientes com FS e com PV, respectivamente (HERTL et al., 1998; LIN et al., 2000). Em ambos os estudos as respostas das células T CD4+ mostraram-se restritas por variantes alélicas de HLA-DR que estão associadas a estas doenças.

A análise de elementos celulares nas lesões epidérmicas do PV e do FS, por meio de caracterização imunofenotípica, demonstrou um infiltrado inflamatório constituído de neutrófilos, mastócitos, linfócitos T CD8+ e CD4+, com predominância desta última população celular (CAPRONI et al., 2001; SANTI e SOTTO, 2001). A influência das células T CD4+ na patogênese do PFE é certamente fundamental se considerarmos as associações bastante significativas com os alelos HLA de classe II, e a importância do reconhecimento dos epítomos da dsg-1 pelos linfócitos T para que ocorram a iniciação e manutenção da produção dos auto-anticorpos pelas células B. A necessidade da colaboração das células T para a produção dos auto-anticorpos do PV foi demonstrada por meio de ensaios *in vitro* (NISHIFUJI et al., 2000), e de experimentos *in vivo* que reproduziram lesões similares as do PV após a transferência de linfócitos de pacientes com esta doença para camundongos imunodeficientes (JUHASZ et al., 1993), mas tais experimentos ainda não foram realizados para o PFE.

## 1.6 CITOCINAS

### 1.6.1 Citocinas e o Paradigma Th1 / Th2 nas Doenças Auto-Imunes

As citocinas são glicoproteínas produzidas por diversos tipos celulares e têm participação importante na hematopoese, nas respostas inflamatórias e imunes. Quando se ligam a receptores específicos na superfície celular dão início à transdução de sinais e acionam mensageiros secundários dentro das células. Elas atuam por meio de uma rede bastante complexa, induzindo ou reprimindo sua própria síntese, assim como a de outras citocinas e respectivos receptores. A sua atividade pode resultar na ativação de genes que induzem processos de divisão, proliferação, diferenciação, migração ou apoptose das células envolvidas (HIBI e HIRANO, 1998; ONISHI et al., 1998; BORISH e STEINKE, 2003).

No início da década de 1990 surgiram as primeiras evidências de subpopulações de células T auxiliares (Th = T *helper*) humanas, cujos padrões de secreção de citocinas eram similares aos dos clones Th1 e Th2 murinos (MOSMANN et al., 1986; WIERENGA et al., 1990; ROMAGNANI, 1991). Nessa mesma época, os termos citocinas Th1/Th2 começaram a ser substituídos por citocinas do tipo 1 e do tipo 2, enfatizando os efeitos imunológicos das mesmas ao invés das células que as originavam. Em geral, as citocinas tipo 1 são classificadas como pró-inflamatórias e as do tipo 2, como antiinflamatórias, embora uma mesma citocina possa atuar de um modo ou de outro, dependendo das circunstâncias no seu local de ação. Os seus efeitos podem ser influenciados por sua própria quantidade e pelas demais citocinas presentes, pela natureza da célula alvo e do sinal de ativação, pela fase de diferenciação da célula Th etc. (CAVAILLON, 2001).

Essa nova classificação em tipos 1 e 2 permite incluir outros tipos celulares como os linfócitos T citotóxicos (CD8+), macrófagos, células dendríticas, células NK (*natural killer*), linfócitos B, mastócitos e eosinófilos, que também produzem citocinas, anteriormente atribuídas aos linfócitos Th1 e Th2. As citocinas produzidas por esta variedade de células são responsáveis pela modulação das respostas imunológicas, inata e específica, que resultam na eliminação de agentes patogênicos.

As células T CD4+ auxiliares (Th = T *helper*) virgens (Th0) são ativadas mediante o reconhecimento de peptídeos antigênicos associados a moléculas HLA de classe II na superfície de células apresentadoras. Estas células precursoras recém-ativadas produzem

IL-2 (IL = Interleucina) para sua própria proliferação e se diferenciam em pelo menos duas subpopulações, Th1 e Th2, que se distinguem pelas citocinas que expressam (O’GARRA e ARAI, 2000; ROMAGNANI, 2000). As células Th1 produzem IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), IL-2, TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e LTA (linfotoxina  $\alpha$ ), que induzem a secreção de anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento pelas células B, ativam macrófagos, a citotoxicidade celular e a imunidade mediada por células. Por outro lado, as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 as quais promovem resposta humoral, inclusive a produção de IgE, e favorecem a diferenciação e ativação de eosinófilos, mas suprimem a imunidade mediada por células. Outras subpopulações também já foram identificadas, como as células Th3 e as T reguladoras 1 (Tr1) que expressam grandes quantidades de TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ), e outras cujos perfis mistos de citocinas não se incluem em nenhuma destas categorias.

Dentre os fatores que estão envolvidos na diferenciação das células Th0 em Th1 ou Th2 se incluem a forma e a dose do antígeno, a afinidade da interação entre o complexo HLA classe II / peptídeo e o receptor da célula T, a afinidade das ligações entre as moléculas co-estimuladoras e também o tipo de célula apresentadora. Entretanto, os principais fatores na sua diferenciação são as citocinas presentes no microambiente em que a célula Th0 é ativada no início da resposta imune. Acredita-se que a presença de IL-4 na fase mais inicial da resposta imune seja crítica para a indução de células Th2, porque esta citocina inibe a produção de IL-12 que, por sua vez, é fundamental para a expressão de IFN $\gamma$  e o desenvolvimento de células Th1 (MURPHY et al., 2000; O’GARRA e ARAI, 2000; ROMAGNANI, 2000).

Os tipos de citocinas que são expressas pelas células Th0, cujo perfil resulta no direcionamento para o fenótipo Th1 ou Th2, parecem estar sob a regulação de diferentes mecanismos. Dentre eles se incluem a expressão diferencial de receptores de citocinas e de fatores de transcrição, a remodelagem da estrutura da cromatina e os padrões de metilação distintos em genes específicos das subpopulações Th1 e Th2 (AGARWAL e RAO, 1998a; AGARWAL e RAO, 1998b; MURPHY et al., 2000).

As citocinas e seus receptores exercem um papel fisiológico importante na regulação da resposta imunológica e dos processos inflamatórios, e qualquer alteração que resulte na sua expressão aberrante ou na falha de sua produção pode contribuir para o estabelecimento de doenças auto-imunes. Isto se deve principalmente à influência destas moléculas imunomoduladoras na polarização das células Th, pois os clones Th1 e Th2

auto-reativos são, dentre as células do sistema imune, provavelmente os mais importantes na indução da auto-imunidade patogênica. A predominância de células Th1 e de um perfil de citocinas tipo 1, ou inversamente, a preponderância de células Th2 e citocinas tipo 2 tem sido implicada na patogênese de várias doenças auto-imunes. Podemos mencionar alguns exemplos como a diabetes melito do tipo I (KENT et al., 2002), a esclerose múltipla (WEINER, 2002), a artrite reumatóide (WAHREN-HERLENIUS et al.; 2002), a uveíte (CASPI, 2002), a miastenia grave (CHRISTADOSS e GOLUSZKO, 2002) e o pênfigo foliáceo endêmico (CAPRONI et al., 2001; LÓPEZ-ROBLES et al., 2001).

### 1.6.2 Participação das Citocinas na Patogênese do Pênfigo

As características das citocinas produzidas pelas células T e por células mediadoras dos processos inflamatórios do pênfigo também têm sido de particular interesse justamente pelas funções imunomoduladoras destas moléculas. Níveis séricos de IL-6 e TNF $\alpha$  significativamente aumentados foram observados em pacientes portadores de PV e apresentaram correlação com a gravidade da doença (D'AURIA et al., 1997). A investigação da expressão da IL-6 e do TNF $\alpha$  nas lesões de vários tipos de pênfigo mostrou a presença de moléculas de RNA mensageiro de ambas citocinas nas células lesionadas que circundam a bolha acantolítica, enquanto nas células perilesionais a expressão era insignificante. Os pacientes com PFE demonstraram expressão mais intensa dos transcritos dos genes *IL6* e *TNF* do que aqueles que manifestavam outros tipos de pênfigo (LÓPEZ-ROBLES et al., 2001). A participação de citocinas pró-inflamatórias na acantólise, como o TNF $\alpha$  e a IL-1, já havia sido sugerida pelo fato de elas induzirem o aumento da expressão do terceiro componente do sistema complemento (FELICIANI et al., 1999; 2000).

Por outro lado, a análise das citocinas que são expressas pelas células T CD4+ tanto periféricas quanto as presentes nas lesões do PFE sugere a predominância de um perfil tipo 2 (LIN et al., 1997; LIN et al., 2000; CAPRONI et al., 2001). No PV, a IL-10 foi detectada no fluido da bolha acantolítica onde possivelmente é produzida pelos queratinócitos (BHOL et al., 2000). Experimentos no modelo murino, que demonstram uma associação entre deficiência de IL-10 e maior suscetibilidade ao PV, reforçam a sugestão de que esta citocina pode contribuir na supressão da acantólise mediante a regulação negativa do TNF $\alpha$  e da IL-1 (TOTO et al., 2000). Podemos considerar que a presença das citocinas

tipo 2 ou antiinflamatórias no local da lesão pode auxiliar no controle da inflamação, e em nível sistêmico influenciar a produção dos auto-anticorpos IgG4, que constitui a subclasse predominante no PFE.

### 1.6.3 Polimorfismo dos Genes das Citocinas nas Doenças Auto-imunes

Vários polimorfismos têm sido identificados principalmente nas seqüências reguladoras e nos introns dos genes das citocinas e de seus receptores (BIDWELL et al., 1998; 1999a; 1999b; 2001; HAUKIM et al., 2002). As substituições de bases nitrogenadas nestas seqüências podem ter um efeito na transcrição, uma vez que podem alterar a estrutura dos sítios de ligação dos fatores gerais de transcrição e de proteínas reguladoras, na região promotora, ou a estrutura dos intensificadores (*enhancers*) localizados nos introns ou em sítios mais distantes.

As investigações da expressão *in vitro* destes genes têm sido realizadas por meio da mensuração dos níveis de transcritos de RNAm ou dos níveis de seus produtos protéicos. Por exemplo, a presença do nucleotídeo C ao invés do G na posição -174 no promotor do gene da IL-6 resulta em diminuição da transcrição (FISHMAN et al., 1998), enquanto a presença de adenina na posição -308 do gene *TNF* está associada com aumento da transcrição (WILSON et al., 1997). Estas e outras observações já relatadas sugerem que a variabilidade dos genes das citocinas pode ser responsável pelas diferenças individuais quanto à capacidade de produção destas moléculas imunomoduladoras.

O desequilíbrio na produção de citocinas pode causar várias anormalidades na resposta imunológica, dentre elas a quebra da tolerância que resulta em auto-imunidade patológica. Muitos destes polimorfismos demonstraram associações com doenças auto-imunes, além de doenças inflamatórias crônicas, doenças infecciosas e neoplasias (BIDWELL et al., 1998; 1999a; 1999b; 2001; HAUKIM et al., 2002). Uma estratégia muito utilizada para investigar associações entre variantes alélicas dos genes das citocinas e doenças tem sido a do estudo caso-controle. Neste tipo de estudo as freqüências alélicas, genotípicas e ou haplotípicas são comparadas entre grupos de pacientes e controles e as diferenças submetidas à análise estatística.

Devemos ressaltar que, devido à complexidade da rede das citocinas e de seus receptores, ao seu modo de atuação em cascatas, ao seu pleiotropismo e redundância, muitas vezes o estudo isolado do polimorfismo de um gene pode não ser informativo. Por

esta razão, as combinações de genótipos de diferentes citocinas também devem ser investigadas porque podem ser responsáveis pela suscetibilidade a certa doença ou ao seu curso clínico.

#### 1.6.4 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ )

O fator de necrose tumoral alfa foi originalmente descrito como uma proteína capaz de eliminar células tumorais e causar necrose hemorrágica em tumores murinos (CARSWELL et al., 1975). Atualmente sabemos que este fator pertence a uma superfamília de proteínas denominada TNFSF (*tumor necrosis factor superfamily*), constituída de dezenove membros, que sinalizam por meio de vinte e nove receptores (AGGARWAL, 2003). À medida que suas atividades biológicas foram sendo identificadas ficou evidente a pluripotência do TNF $\alpha$ , cujas funções variam desde a promoção da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular até a indução de apoptose (LOCKSLEY et al., 2001; HEHLGANS e MANNEL, 2002). Além de suas funções normais, principalmente relacionadas à regulação das reações inflamatórias locais e sistêmicas, o TNF $\alpha$  também está implicado no choque séptico e na fisiopatologia de várias doenças.

O gene que codifica o TNF $\alpha$  está localizado no braço curto do cromossomo 6, em 6p21.3, e inserido na região de classe III do Complexo Principal de Histocompatibilidade (NEDWIN et al., 1985). A expressão do gene *TNF* pode ser induzida por uma variedade de estímulos e em diversos tipos celulares, tais como linfócitos, células NK, neutrófilos, mastócitos, queratinócitos, embora os macrófagos e monócitos sejam a principal fonte desta citocina (MAKHATADZE, 1998).

A molécula de TNF $\alpha$  pode se apresentar ancorada à membrana celular ou ser liberada em sua forma solúvel, por meio de clivagem por metaloproteinases (MAKHATADZE, 1998). As suas atividades biológicas são decorrentes da ligação dos homotrímeros, que constituem a forma ativa, aos seus receptores que pertencem à superfamília TNFRSF (*tumor necrosis factor receptor super family*) (LOCKSLEY et al., 2001; HEHLGANS e MANNEL, 2002). Dois destes receptores são bem caracterizados, o TNF-R1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) e o TNF-R2 (*tumor necrosis factor receptor 2*), os quais são também denominados TNFRSF1A e TNFRSF1B, respectivamente. O primeiro é de expressão ubíqua e está presente em praticamente todas as células nucleadas do organismo e o segundo é de expressão mais restrita às células da linhagem

hematopoética. Apesar de apresentarem similaridade nos domínios extracelulares, eles diferem na porção intracitoplasmática e utilizam vias distintas para a transdução de sinais (AGGARWAL, 2003). O TNF-R2 tem maior afinidade pela molécula de TNF $\alpha$  e se liga mais facilmente na presença de concentrações mais baixas desta citocina. Este receptor parece estar envolvido na sinalização que induz a proliferação de linfócitos T e as respostas pró-inflamatórias. Ao contrário, o TNF-R1 se associa ao TNF $\alpha$  em concentrações mais elevadas e promove sinalizações de morte celular. Ambos receptores também são encontrados em sua forma solúvel, cujas funções são a de modulação das atividades do TNF $\alpha$ . Por um lado, neutralizam a molécula de TNF $\alpha$ , mediante a competição com os receptores integrados à membrana celular, e, por outro, conferem estabilidade a esta molécula porque impedem a sua degradação.

O TNF $\alpha$  é um fator que determina a intensidade, a eficiência e a duração de reações inflamatórias locais ou sistêmicas porque, além de suas propriedades pró-inflamatórias potentes, em geral no início de processos infecciosos, ele atua como agente antiinflamatório ou imuno-regulador nas fases mais tardias da resposta imunológica. No entanto, as funções biológicas normais do TNF $\alpha$  estão relacionadas à sua concentração e à duração da exposição a esta citocina. Desequilíbrios na sua produção estão associados com choque séptico induzido pelas endotoxinas bacterianas, e também com diversas doenças, incluindo as auto-imunes (BEUTLER e GRAU, 1993; KÖRNER e SEDGWICK, 1996).

A importância do controle da produção do TNF $\alpha$  é evidente, e, além da modulação conferida pela interação com seus receptores solúveis, outros fatores podem estar envolvidos tanto na transcrição quanto na estabilidade de seu RNA mensageiro ou ainda na etapa de clivagem de sua forma ligada à membrana. As quantidades de seus receptores também contribuem na regulação das atividades do TNF $\alpha$ ; inclusive tem sido considerada a possibilidade de que a razão TNF $\alpha$ /TNFR possa predizer o curso evolutivo de doenças (McDERMOTT, 2001). Ao lado destes mecanismos, os níveis de TNF $\alpha$  podem estar sujeitos ao controle genético (HAJEER e HUTCHINSON, 2000). Os genes *TNFRSF1A* e *TNF* mostram variabilidade em suas seqüências de DNA, e certos polimorfismos parecem influenciar os seus níveis de produção.

Vários polimorfismos têm sido identificados no gene *TNF* e nas suas adjacências, e muitas destas variantes alélicas estão em desequilíbrio de ligação com as de outros genes situados neste complexo, inclusive os genes HLA. No loco do *TNF* estão identificadas

cinco regiões de microssatélites, o *TNFA* e o *TNFB* são repetições de (GT)<sub>n</sub> e (GA)<sub>n</sub>, respectivamente, e estão localizados a uma distância de 3,5 kb do gene *LTA*, na direção do telômero (UDALOVA et al., 1993). O *TNFC* é constituído de repetições (GA)<sub>n</sub> e se encontra no primeiro intron do gene *LTA*. Outros dois microssatélites, o *TNFD* e o *TNFE*, são repetições (GA)<sub>n</sub> e estão 8 a 10 kb distantes e centroméricos ao gene *TNF*, mas a jusante do gene *LTA* (JONGENEEL et al., 1991; NEDOSPASOV et al., 1991).

A região reguladora do gene *TNF* apresenta várias mutações de ponto, que se localizam nas posições -1031 (T→C), -863 (C→A), -857 (C→A), -851 (C→T), -574 (G→A), -419 (inversão G→C), -376 (G→A), -308 (G→A), -244 (G→A), -238 (G→A), -163 (G→A) e -49 (G→A), e estão numeradas em relação ao ponto inicial da transcrição. A maioria destas substituições constitui polimorfismos bialélicos, mas alguns alelos mais raros, como os das posições -419, -163 e -49, em geral mostram frequências inferiores a 1% nas populações estudadas. Além destas substituições, há troca de guanina por adenina na posição +488 e a deleção de uma guanina na posição +691, ambas no primeiro intron (D'ALFONSO e RICHIARDI, 1996; ASMY et al., 1999), além da inserção de citosina na posição +70 do primeiro exon (D'ALFONSO e RICHIARDI, 1996).

As implicações da variabilidade genética do *TNF* sobre os níveis de sua própria produção têm sido investigadas. Em relação aos microssatélites, os resultados obtidos por POCIOT et al. (1993), DERKX et al. (1995) e TURNER et al. (1995) indicam que outros polimorfismos situados nos haplótipos estendidos devem influenciar os níveis de TNF $\alpha$ , ao invés das seqüências dos microssatélites propriamente ditas.

Com respeito às mutações de ponto, a relevância funcional de alguns polimorfismos foi analisada a partir de expressão de genes repórteres sob o comando de fragmentos da região reguladora do *TNF* ou pela mensuração da quantidade de TNF $\alpha$  produzida por células estimuladas com mitógenos ou lipopolissacarídeo. A posição -308 foi uma das mais extensivamente estudadas, e o alelo -308 A foi associado com maior produção de TNF $\alpha$ , embora este resultado não tenha sido confirmado em todos os estudos (HUIZINGA et al., 1997; KROEGER et al., 1997; WILSON et al., 1997; LOUIS et al., 1998). As investigações da posição -238 apresentaram resultados conflitantes em relação ao efeito de suas variantes alélicas (GROVE et al., 1997; UGLIALORO et al., 1998). Numa análise da evolução dos haplótipos estendidos do CPH, aqueles que incluíam -308 A e -238 A estavam geralmente associados com alta produção enquanto os que apresentavam -308 G e -238 G, com baixa produção de TNF $\alpha$  (WEISSENSTEINER e LANCHBURY, 1997).

Porém, a relevância funcional das posições -238 e -308 ainda é questionável, e as associações encontradas podem ser decorrentes do desequilíbrio de ligação entre os seus alelos e os de outros polimorfismos presentes nos mesmos haplótipos.

Posteriormente, foi demonstrado que os nucleotídeos -376, -857 e -863 constituem sítios de ligação para o fator de transcrição ubíquo (OCT-1), o que torna seus polimorfismos candidatos a uma participação direta na regulação da expressão do gene *TNF* (KNIGHT et al., 1999; SKOOG et al., 1999; HOHJOH e TOKUNAGA, 2001). Embora o alelo -376 A se associe ao fator OCT-1, o seu efeito sobre a produção de  $TNF\alpha$  não foi claramente demonstrado (HUIZINGA et al., 1997). Os alelos -857 T e -863 A foram associados com aumento significativo da transcrição (HIGUCHI et al., 1998; HOHJOH e TOKUNAGA, 2001), mas a análise da posição -863 nos experimentos de SKOOG et al. (1999) mostrou resultados opostos. Entretanto, devemos considerar que a regulação genética da produção de  $TNF\alpha$  pode ser decorrente do efeito conjunto de vários polimorfismos distribuídos ao longo de um haplótipo, incluindo outras regiões situadas mais a montante da região reguladora, ou ainda por seqüências de DNA bem mais distantes do gene *TNF*.

Os estudos para investigar a influência dos polimorfismos do gene *TNF* na suscetibilidade ou modulação de doenças são mais complicados, principalmente pelo desequilíbrio de ligação entre as variantes deste gene com as dos genes do complexo *HLA*. Alguns polimorfismos do *TNF* integram, junto com alelos dos genes *HLA* de classes I e II, haplótipos estendidos que estão associados a várias doenças auto-imunes. Apesar destas dificuldades, associações independentes das variantes alélicas dos genes *HLA* foram identificadas em alguns estudos. Por exemplo, as associações do genótipo G/A da posição -238 do gene *TNF* com descréscimo dos processos erosivos nas articulações em pacientes com artrite reumatóide e da variante -308 A com a suscetibilidade ao lupus eritematoso sistêmico (BRINKMAN et al., 1997; SULLIVAN et al., 1997). Em outro estudo, a presença da variante alélica *TNF* -857 T, que está associada com manifestação sistêmica da artrite reumatóide juvenil, parece intensificar o efeito do haplótipo *DRB1\*0405-DQB1\*0401* (SEKI et al., 1999). Muitas vezes são necessárias análises de haplótipos estendidos em amostras grandes para revelar se as associações verdadeiras são com alelos que afetam a produção do  $TNF\alpha$ , com as moléculas *HLA*, com outros genes do CPH ou ainda com variantes alélicas de dois ou mais genes presentes no mesmo haplótipo.

Muitos outros estudos têm investigado associações entre as variantes polimórficas do loco *TNF* e neoplasias, doenças infecciosas, doenças inflamatórias crônicas e doenças auto-imunes. Os resultados obtidos são os mais diversos e às vezes conflitantes; alguns mostram ausência de associação, outros sugerem que a associação é independente, outros ainda, que é secundária ao desequilíbrio de ligação com os genes *HLA* (BIDWELL et al., 1999a; 2001; HAUKIM et al., 2002).

#### 1.6.5 Complexo da Interleucina 1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-1Ra)

Os produtos dos genes *IL1A* e *IL1B* são citocinas multifuncionais, de ação local ou sistêmica, que possuem um amplo espectro de propriedades inflamatórias, metabólicas, fisiológicas, hematopoéticas e imunológicas (DINARELLO, 1991; 1996; 1998; 2003). No sítio de inflamação, estas citocinas induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais a fim de facilitar o influxo de neutrófilos, monócitos, células T e B. Exercem quimiotaxia sobre células que participam de processos de inflamação aguda como os neutrófilos e ativam o seu metabolismo oxidativo. Em nível sistêmico atuam como agente pirogênico, induzem a síntese das proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, e também a produção e liberação de prostaglandinas e colagenase pelos fibroblastos e células sinoviais.

Uma das principais atividades biológicas da IL-1 é a de induzir as células Th a secretar IL-2 e a expressar os receptores IL-2R, mas atua também sobre as células B promovendo sua proliferação, a síntese de imunoglobulinas, e a sua sensibilização à ação da IL-5. A IL-1 ainda estimula a proliferação e ativação das células NK e de outros tipos celulares, como as células de Langerhans da pele que se tornam potentes estimuladoras da resposta imune após a ação desta citocina (DINARELLO, 1991; 1996). As interleucinas-1 compartilham várias propriedades pró-inflamatórias e / ou imunológicas com o TNF $\alpha$  e a IL-6 e diferem quanto a outras atividades.

O gene da IL-1 $\alpha$  (*IL1A*) e o da IL-1 $\beta$  (*IL1B*) são constituídos de sete exons e estão localizados no braço longo do cromossomo 2 próximos ao gene *IL1RN* que codifica a molécula antagonista IL1Ra (WEBB et al., 1986; NICKLIN et al., 1994). As citocinas IL1- $\alpha$  e IL1- $\beta$  são sintetizadas como precursores de aproximadamente 35 kDa e as respectivas proteínas maduras de 17 kDa são geradas por clivagem proteolítica. Apesar de as duas formas de IL-1 apresentarem somente cerca de 27% de identidade entre suas seqüências, a

similaridade de suas estruturas tridimensionais permite que se liguem aos mesmos receptores e compartilhem funções biológicas. No entanto, existem diferenças na regulação da expressão gênica, na estabilidade do RNAm, na tradução, no processamento e na secreção destas duas citocinas (DINARELLO, 1996; 1998). A ação da IL-1 $\alpha$  está mais associada à regulação de eventos intracelulares e mediação de inflamação local, enquanto a IL-1 $\beta$  parece exercer uma ação mais sistêmica.

A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  podem ser produzidas por linfócitos T e B, células NK, neutrófilos, células endoteliais, células epiteliais, células dendríticas e outras. Porém, os fagócitos mononucleares (monócito/macrófago) ativados constituem a principal fonte de IL-1 $\beta$ , a forma mais abundante na circulação, enquanto os queratinócitos secretam grandes quantidades de IL-1 $\alpha$ . A síntese da IL-1 pode ser induzida por estímulos antigênicos e por outras citocinas, e a sua produção pode ser controlada pelo seu inibidor natural IL-1Ra, pelas formas solúveis de seus receptores e por outros fatores como as citocinas tipo 2.

As proteínas antagonistas IL-1Ra apresentam uma isoforma solúvel e três isoformas intracitoplasmáticas, que são resultantes do processamento alternativo envolvendo os dois primeiros dos quatro exons que constituem o gene *IL1RN* (AREND e GUTHRIDGE, 2000). A IL-1Ra solúvel pode ser secretada por monócitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e outros tipos celulares, e as isoformas que permanecem no citoplasma apresentam expressão constitutiva principalmente nos queratinócitos e em algumas células epiteliais. Estas proteínas antagonistas inibem a liberação de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , a secreção de IL-2 e a expressão de seus receptores na superfície celular. As formas intracelulares da IL-1Ra parecem inibir a ligação da IL-1 $\alpha$  aos receptores nucleares, embora outras funções ainda não tenham sido elucidadas.

Existem dois receptores da IL-1, o IL-1RI que é biologicamente ativo, e o IL-1RII, que atua como um receptor negativo por não promover a sinalização intracelular (SIMS, 2002). Este receptor inerte (IL-1RII), de modo similar à proteína antagonista IL-1Ra, regula a atividade da IL-1. Quanto ao IL-1RI, que é responsável pela transdução de sinais, após formar um complexo com a IL-1 se associa a um terceiro componente denominado proteína acessória do receptor tipo I (IL1RI-AcP). A heterodimerização dos domínios citosólicos do IL1RI e da IL1RI-AcP parece necessária à indução da transdução dos sinais. Acredita-se que a intensidade da sinalização induzida pela IL-1 seja devida à amplificação de múltiplos eventos de fosforilação pela ação das quinases de proteína que, por sua vez,

resultam na translocação de fatores de transcrição, principalmente o NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-B*) e o AP-1 (proteína ativadora-1), os quais são comuns a muitos genes induzidos pela IL-1.

A investigação da variabilidade do complexo gênico *IL1* levou à descoberta de muitos polimorfismos, alguns localizados nos introns ou nas regiões codificadoras e outros na região reguladora destes genes. O *IL1A* mostrou um número variável de repetições em tandem (VNTR), de uma seqüência de 46 pares de bases, no intron 6 (BAILLY et al., 1993). Outros polimorfismos de comprimento constituídos de repetições de dinucleotídeos (TODD e NAYLOR, 1991; EPPLIN et al., 1994) e de trinucleotídeos (ZULIANI e HOBBS, 1990) também foram encontrados. KORNMAN e DI GIOVINE (1998) localizaram neste gene a substituição de citosina (C) por timina (T) e de timina (T) por guanina (G) nas posições -889 e +4345, respectivamente.

Substituições de ponto foram também encontradas em algumas posições do gene *IL1B*: guanina (G) por adenina (A) em -511; timina (T) por citosina (C) em -35; citosina (C) por timina (T) em +3954; além da presença de adenina (A), ao invés de timina (T) no nucleotídeo 5810 e de citosina (C) no lugar de timina (T) no nucleotídeo 3263 (DI GIOVINE et al., 1992; POCIOT et al., 1992; GUASCH et al., 1996; LANGDAHL et al., 2000). Ensaios de expressão *in vitro* demonstraram que o alelo +3954 T, localizado no quinto exon, está associado com aumento da transcrição (POCIOT et al., 1992).

No segundo intron do gene *IL1RN* foi identificado um VNTR constituído por uma seqüência de 86 pares de bases, que apresentou resultados controversos quanto à influência de suas variantes alélicas na sua expressão (TARLOW et al., 1993; DANIS et al., 1995; TOUNTAS et al., 1999). Substituições de ponto foram observadas nos nucleotídeos 1731 (G→A), 1821 (G→A), 1868 (A→G), 1887 (G→C), 1934 (T→C), 8006 (T→C), 8061 (C→T), 9589 (A→T), 11.100 (T→C) por GUASCH et al. (1996) e LANGDAHL et al. (2000). Outra substituição de timina por citosina, na posição +2016, foi localizada por KORNMAN e DI GIOVINE (1998).

A multiplicidade de funções da IL-1 $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  as torna importantes mediadoras da defesa de um indivíduo, mas desequilíbrios na sua produção ou na do seu antagonista natural IL-1Ra podem contribuir na patogênese de várias doenças. Níveis elevados de IL-1, muitas vezes acompanhados de aumento de IL-6 e de TNF $\alpha$ , são observados em doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes. A descoberta de que certos alelos destes genes

podem influenciar o seu nível de expressão desencadeou uma série de estudos que buscava a identificação de fatores genéticos de suscetibilidade ou de modulação destas doenças.

A variante -889 T do gene *IL1A* foi associada com artrite reumatóide juvenil e às complicações oculares desta doença (McDOWELL et al., 1995), e a variante +3954 C do gene *IL1B* mostrou associação positiva com a forma mais grave de artrite reumatóide (BUCHS et al., 2001), com nefropatia diabética (LOUGHREY et al., 1998) e com miastenia gravis (HUANG et al., 1998). Os alelos -511 A e +3954 T do gene *IL1B* parecem influenciar na evolução clínica da doença inflamatória do intestino (NEMETZ et al., 1999). A variante com duas repetições do VNTR, que se encontra no segundo intron do gene *IL1RN*, foi associada à forma de manifestação mais grave do lupus eritematoso sistêmico (BLAKEMORE et al., 1994). Além destas, várias outras associações positivas ou negativas foram encontradas em uma variedade de doenças (BIDWELL et al., 1999a; 2001; HAUKIM et al., 2002).

#### 1.6.6 Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina 6 foi inicialmente identificada como um fator que induz a produção de imunoglobulinas pelas células B ativadas, e por esta razão foi denominada fator de diferenciação de células B ou BSF-2 (*B cell stimulatory factor-2*) (MURAGUCHI et al., 1981). Atualmente a IL-6 é reconhecida como uma citocina que exerce ampla gama de funções biológicas relacionadas à regulação da resposta imune, da hematopoese, da resposta da fase aguda e dos processos inflamatórios. Atua na formação de colônias de células multipotentes hematopoéticas, promove a diferenciação de macrófagos, megacariócitos e osteoclastos. Estimula os hepatócitos a produzir as proteínas de fase aguda, induz febre e leucocitose. Sua ação como fator de crescimento resulta também na proliferação de células mesangiais e queratinócitos da epiderme. A IL-6 também promove a proliferação ou diferenciação das células T citotóxicas e está envolvida no controle da diferenciação de células T auxiliares em Th1 ou Th2.

O gene da IL-6, constituído de cinco exons e quatro introns, foi isolado e caracterizado por YASUKAWA et al. (1987), e teve sua localização cromossômica atribuída por FERGUSON-SMITH et al. (1988) à região p15-p21 do cromossomo 7. Este gene é expresso por vários tipos de células, linfóides e não linfóides, tais como: células T e B, monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, células mesangiais e células

tumorais (KISHIMOTO et al., 1995). A sua produção não é constitutiva, mas induzida em resposta a estímulos inflamatórios, como a IL-1 e o TNF $\alpha$ , e a antígenos procedentes de agentes infecciosos.

A pleiotropia e a redundância da IL-6 se devem em parte à natureza do seu receptor (IL-6R), que é constituído por dois polipeptídeos, uma cadeia  $\alpha$  denominada glicoproteína 80 (gp 80) que se associa ao ligante, e uma cadeia  $\beta$  denominada glicoproteína 130 (gp130) que é responsável pela transdução de sinais após a formação de um complexo hexamérico (BOULANGER et al., 2003). A transdução de sinais através da cadeia  $\beta$  é efetuada por duas vias. A primeira utiliza as quinases de tirosina da família Janus (JAK1, JAK2, JAK3 e TyK-2) e os fatores de transcrição STAT3, e em menor extensão o STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*). A segunda via envolve a quinase de proteína ativada por mitógeno (MAPK) dependente de Ras e o fator de transcrição NF-IL6 (*nuclear factor-IL6*) (NAKA et al., 2002; KAMIMURA et al., 2003).

A ligação da IL-6 com a forma solúvel do IL-6R $\alpha$  pode promover a trans-sinalização, que se refere à capacidade destes complexos de induzir resposta biológica nas células que expressam apenas a cadeia  $\beta$  na ausência do IL-6R $\alpha$  (KALLEN, 2002). O efeito anti-apoptótico destes complexos pode ter implicações na auto-imunidade tecido-específica, assim como na gênese de tumores (MONTERO-JULIAN, 2001). Estas diversas vias de sinalização e a expressão ubíqua da gp130 conferem a IL-6 uma amplitude de ação, pois regulam a expressão de genes envolvidos no crescimento, na diferenciação e na sobrevivência de muitos sistemas celulares.

Em conseqüência a sua multiplicidade de funções, os desequilíbrios na produção da IL-6 estão implicados na fisiopatologia de uma diversidade de doenças (ISHIHARA e HIRANO, 2002; NAKA et al., 2002). Níveis elevados de IL-6, por meio da análise da proteína ou de seus transcritos, foram observados, por exemplo, no mieloma múltiplo (LAUTA, 2003), na doença inflamatória do intestino (GROSS et al., 1992), na artrite reumatóide (SACK et al., 1993; MADHOK et al., 1993), na artrite crônica juvenil (DE BENEDETTI et al., 1991), no lupus sistêmico eritematoso (SPRONK et al., 1992; MEIJER et al., 1993), no penfigóide bolhoso (D'AURIA et al., 1999), no pênfigo paraneoplásico (NOUSARI et al., 1999), no pênfigo vulgar, no pênfigo foliáceo (D'AURIA et al., 1997; LÓPEZ-ROBLES et al., 2001).

As evidências do envolvimento da IL-6 na auto-imunidade patogênica despertaram o interesse de muitos pesquisadores no que diz respeito à influência da sua variabilidade

genética no desenvolvimento ou na evolução clínica destas doenças. Dentre os polimorfismos presentes no gene da IL-6 inclui-se um segmento constituído de repetições de dinucleotídeos AT localizado a jusante (3') da região codificadora, cuja variabilidade de comprimento foi detectada pela digestão com a enzima *Xba*I (BOWCOCK et al., 1989). Os alelos observados como produtos de PCR cujos tamanhos são inferiores ou iguais a 792 pb foram associados ao lupus eritematoso sistêmico, tanto em caucasóides como em negróides norte-americanos (LINKER-ISRAELI et al., 1996); além de apresentarem correlação com níveis de expressão mais elevados da IL-6 (LINKER-ISRAELI et al., 1999). Embora a função desta seqüência minissatélite não seja conhecida, é possível que exerça alguma influência na expressão gênica. Outros polimorfismos também foram identificados por meio de digestão com enzimas de restrição, tais como a *Msp*I (FUGGER et al., 1989a) e a *Bgl*III (BLANKESTEIN et al., 1989), as quais provavelmente identificam substituições de bases no quinto exon e na região flanqueadora a montante (5'), respectivamente. Eles foram investigados em pacientes com artrite reumatóide, artrite crônica juvenil pauciarticular e no lupus sistêmico eritematoso, mas não demonstraram associações com estas doenças (FUGGER et al., 1989b).

Na região promotora do gene da IL-6 foram identificadas substituições de ponto nas posições -634 (G→C), -622 (G→A), -597 (G→A), -572 (G→C), -174 (G→C), e também um segmento rico em adenina e timina entre as posições -392 e -373, cujo polimorfismo é referido como -373 A(n)T(n). Porém, o polimorfismo dialélico mais extensivamente investigado é o da posição -174 (OLOMOLAIYE et al., 1998). O seu significado funcional foi avaliado por FISHMAN et al. (1998), que correlacionaram a presença do alelo -174 C com uma diminuição da expressão *in vitro* e também com níveis plasmáticos inferiores desta citocina. Ainda neste estudo, foi observada uma frequência significativamente inferior do genótipo C/C nos pacientes com manifestação sistêmica da artrite crônica juvenil. Um outro estudo mostrou que os genótipos das posições -174 e -622, cujos alelos estavam em desequilíbrio de ligação absoluto, não conferem suscetibilidade à artrite reumatóide, mas podem influenciar a idade de manifestação da doença (PASCUAL et al., 2000).

O alelo -174 G foi associado com a suscetibilidade à diabetes melito do tipo I (JAHROMI et al., 2000) e com manifestações clínicas e imunológicas do lupus eritematoso sistêmico (SCHOTTE et al., 2001). Entretanto, nenhuma associação foi observada entre as

variantes -174 G e -597 G, que estavam em desequilíbrio de ligação completo, e suscetibilidade à esclerose múltipla (FEDETZ et al., 2001).

Uma outra análise da expressão da IL-6 *in vitro* sugere que os polimorfismos da região promotora influenciam a sua transcrição mediante interações complexas determinadas pelos haplótipos, e não apenas pela variante alélica de uma única posição (TERRY et al., 2000). Segundo estes autores, o haplótipo de *IL6* -597 G -572 G -373 (A9T11) -174 G estava associado com nível mais elevado de transcrição, enquanto o haplótipo -597 A -572 G -373 (A8T12) -174 G resultou em níveis inferiores desta citocina. Porém, um outro haplótipo de *IL6* contendo a variante -174 C apresentou expressão mais elevada do que este último, contrastando com os resultados de FISHMAN et al. (1998) que identificaram a variante -174 C como determinante da menor expressão de *IL6*. Por outro lado, RIVERA-CHAVEZ et al. (2003) observaram que a produção de IL-6, após estimulação com LPS, era mais elevada em células homocigotas para os haplótipos -597 G -174 G e menor nas células homocigotas contendo -597 A -174 C. A mensuração da ligação de proteínas nucleares aos oligonucleotídeos sintéticos, incluindo a região polimórfica -174, demonstrou que elas se ligam com maior avidéz na presença de guanina ao invés de citosina na posição -174. Estes dados corroboram os de FISHMAN et al. (1998) com respeito ao efeito das variantes alélicas da posição -174.

#### 1.6.7 Interleucina 4 (IL-4) e Receptor da Interleucina 4 (IL-4R $\alpha$ )

A IL-4 é a citocina mais marcante na polarização das células Th0 em Th2, e atua tanto na fase indutora como na fase efetora da resposta imune predominantemente Th2. Este tipo de resposta confere imunidade protetora contra helmintos e outros parasitas extracelulares mas, por outro lado, pode resultar em manifestações atópicas. Em nível de células B, a IL-4 age induzindo sua proliferação e aumentando sua capacidade de apresentação de antígeno, pois aumenta a expressão de moléculas de classe II e de certas moléculas co-estimuladoras. Também intensifica a expressão de IgM de superfície, de receptores da IgE e influencia a mudança de classe de imunoglobulina, de IgM para IgE ou para IgG4. Entre outros efeitos da IL-4 se inclui a inibição da imunidade celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF $\alpha$ , bem como a estimulação da molécula antiinflamatória IL-1Ra (VANNIER et al., 1992; NELMS et al., 1999; BORISH e STEINKE, 2003).

O gene que codifica a IL-4 é organizado em quatro exons e está localizado em 5q31.1 (ARAI et al., 1989; LE BEAU et al., 1993). O seu produto, uma glicoproteína de 18 kDa, é expresso somente em algumas células do sistema imune como os linfócitos Th0 e Th2, células NK1.1T, eosinófilos, basófilos e mastócitos. O seu receptor específico, denominado IL-4R $\alpha$ , é uma proteína transmembrânica de 140 kDa cujo gene foi atribuído ao cromossomo 16, em 16p11.2 - p12.1 (PRITCHARD et al., 1991). O receptor é de expressão mais ampla que o seu ligante, pois está presente nas células hematopoéticas, endoteliais, epiteliais, musculares, cerebrais, fibroblastos e hepatócitos.

A ligação de alta afinidade da IL-4 com IL-4R $\alpha$  induz à dimerização da cadeia alfa deste receptor com uma segunda cadeia polipeptídica. Quando IL-4R $\alpha$  se associa com a cadeia comum gama (IL-2R $\gamma$ ), um componente compartilhado pelos receptores de várias citocinas, resulta na formação do receptor tipo I. Porém, se a união for com a cadeia do receptor da IL-13 (IL-13R $\alpha$ 1) leva à formação do receptor tipo II. Ao contrário da IL-13, a IL-4 pode se ligar a estes dois tipos de receptor. Pelo fato de utilizarem a mesma cadeia IL-4R $\alpha$  como um dos componentes de seus receptores, ambas citocinas compartilham a utilização de algumas vias de sinalização. As regiões carboxi-terminais tanto de IL-4R $\alpha$  quanto de IL-13R $\alpha$ 1 iniciam a cascata de sinalização via quinases de tirosina da família Janus (JAK), as quais promovem interações com o fator de transcrição STAT6, que, por sua vez, se liga às seqüências consenso nas regiões promotoras dos genes regulados pela IL-4 e / ou IL-13 (NELMS et al., 1999; KELLY-WELCH et al., 2003). Além da via JAK/STAT, as citocinas IL-4 e IL-13 podem ativar outras moléculas sinalizadoras, por mecanismos independentes do STAT6, que são importantes na regulação de certas atividades biológicas da IL-4, como a indução da proliferação e a inibição de apoptose celular. Por exemplo, a estimulação da via da fosfatidilinositol 3-quinase mediante o recrutamento de membros da família de substratos do receptor da insulina (JIANG et al., 2000; BOOTHBY et al., 2001).

Dentre os polimorfismos identificados no gene da IL-4 se incluem regiões que apresentam números variáveis de repetições em tandem, uma localizada no intron 2 e outra no intron 3 (MOUT et al., 1991; MARSH et al., 1994), além de substituições de ponto nas posições -590 (C $\rightarrow$ T) e -34 (C $\rightarrow$ T) da região reguladora (BORISH et al., 1994; SUZUKI et al., 1999; TAKABAYASHI et al., 1999). Segundo estes últimos autores, os alelos -590 T e -34 T estavam em desequilíbrio de ligação absoluto na população japonesa que foi

analisada. As posições *IL4* -590 e *IL4* -34 são numeradas a partir do códon de iniciação e correspondem às posições -523 e +33, respectivamente, estas últimas contadas a partir do início da transcrição. O alelo 2 do microssatélite localizado no terceiro intron, a presença de timina nas posições -590 ou -34, e certas combinações genotípicas ou haplotípicas destas variantes alélicas estão associadas com aumento da atividade de transcrição deste gene (ROSENWASSER et al., 1995; SONG et al., 1996; ROSENWASSER e BORISH, 1997; NAKASHIMA et al., 2002).

Investigações da variabilidade genética destes polimorfismos mostraram associações dos alelos que aumentam a produção de IL-4 com manifestações mais graves de asma (SANDFORD et al., 2000) e com disfunção pulmonar em pacientes asmáticos (BURCHARD et al., 1999). O genótipo T/T da posição -590 também foi associado com suscetibilidade à dermatite atópica (KAWASHIMA et al., 1998).

Ao contrário, nas doenças auto-imunes com predominância de respostas Th1, as variantes polimórficas que intensificam a produção de IL-4 parecem ter um efeito protetor. A presença destes alelos foi associada com manifestações mais brandas da artrite reumatóide (GENEVAY et al., 2002), com curso clínico não destrutivo na poliartrite crônica (BUCHS et al., 2000) e estabelecimento tardio das manifestações clínicas na esclerose múltipla (VANDENBROECK et al., 1997; KANTARCI et al., 2003).

Na região codificadora do gene *IL4R* foram encontradas substituições de ponto nos nucleotídeos 148 (A→G), 426 (C→T), 747 (C→G), 864 (T→C), 1124 (A→C), 1167 (G→T), 1216 (T→C), 1218 (C→T), 1224 (T→C), 1232 (C→T), 1682 (T→C), 1902 (G→A), 2281 (T→C) e na posição +1654 (G→A) (DEICHMANN et al., 1997; HERSHEY et al., 1997; KRUSE et al., 1999; LOZANO et al., 2001). A maioria destas substituições está localizada no exon 11, que codifica mais de dois terços da proteína madura e inclui quase toda a porção citoplasmática.

Experimentos para investigar as implicações funcionais da variabilidade genética deste receptor mostraram que a presença de adenina no nucleotídeo 148, que corresponde à isoleucina ao invés de valina no códon 50, está associada com o aumento da ativação do STAT6 e conseqüente aumento da proliferação celular e da síntese de IgE (MITSUYASU et al., 1998). Os alelos *IL4R* nt 1682 C (códon 478P, previamente denominado 503P) e *IL4R* nt 1902 G (códon 551R) estão associados a concentrações mais baixas de IgE, possivelmente pela influência destes alelos na transdução de sinais mediada por este receptor (KRUSE et al., 1999). Ao contrário, o outro alelo do nucleotídeo 1902, que

contém adenina, interfere na ligação de uma molécula de regulação negativa resultando em aumento da atividade do receptor (IMANI et al., 1997). Uma análise realizada por OLAVESSEN et al. (2000) mostrou que as variantes dos nucleotídeos 148 (códon 50) e 1902 (códon 551, previamente 576), apesar de separadas por somente cerca de vinte e uma kilobases de DNA genômico, não estão em desequilíbrio de ligação. Este resultado sugere a necessidade de um mapeamento de SNP bastante denso para detectar ou excluir associações entre as variantes deste gene e doenças.

Na região reguladora foram identificadas substituições de timina por citosina nas posições -890 e -1914, e a substituição de citosina por timina na posição -3223, além de uma seqüência (CAAAA) contendo número variável de repetições em tandem na posição -3600 (HACKSTEIN et al., 2001). Segundo estes autores, a variante -3223 T está associada com diminuição dos níveis da forma solúvel deste receptor, o que os leva a concluir que esta posição polimórfica na região promotora pode estar implicada na regulação das vias de sinalização induzidas pela IL-4.

Estudos para averiguar a influência das variantes alélicas do receptor IL-4R $\alpha$  foram, em sua maioria, realizados com processos inflamatórios alérgicos devido à participação deste receptor na mediação destas doenças. A presença de adenina no nucleotídeo 148 (isoleucina no códon 50) ou de guanina no nucleotídeo 1902 foi associada com asma atópica (MITSUYASU et al., 1998; KRUSE et al., 1999; ROSA-ROSA et al., 1999; TAKABAYASHI et al., 2000). O alelo *IL4R* nt148 A também foi associado ao lupus eritematoso sistêmico, uma doença auto-imune com predominância de resposta Th2 (KANEMITSU et al., 1999).

#### 1.6.8 Interleucina 10 (IL-10)

A interleucina 10 foi inicialmente identificada como um fator de inibição da síntese de citocinas, denominado CSIF (*Cytokine Synthesis Inhibitor Factor*), devido a sua propriedade de suprimir a ativação e a produção de citocinas pelas células Th1 (FIORENTINO et al., 1989). Atualmente é reconhecida como uma citocina pleiotrópica que regula uma variedade de funções das células hematopoéticas. Uma de suas principais atividades é a limitação e a terminação dos processos inflamatórios decorrentes da resposta imune mediada por células Th1, evitando lesões teciduais mais graves. Esta atividade antiinflamatória se deve em parte à sua ação sobre os macrófagos e monócitos (MOORE et

al., 2001), inibindo-os de produzir citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de vários tipos celulares aos sítios de inflamação. Também inibe nestas células a expressão de moléculas co-estimuladoras, moléculas HLA de classe II e de certos receptores, como os da IL-1, além de aumentar a expressão de moléculas antiinflamatórias como a IL-1Ra.

Os efeitos da IL-10 sobre macrófagos, monócitos e células dendríticas afetam sua capacidade de apresentação de antígeno prejudicando a estimulação das células T. Porém, a supressão das células Th1 por esta citocina ocorre não apenas indiretamente por meio de sua ação sobre as células apresentadoras de antígeno, mas também por mecanismos diretos, por exemplo, pelo bloqueio da síntese do IFN $\gamma$  (MOORE et al., 2001). Por outro lado, a IL-10 intensifica a resposta humoral, pois juntamente com a da IL-2 e IL-4 induz a proliferação de linfócitos B ativados, além de influenciar na sua diferenciação e no desvio de classe de imunoglobulinas (MOORE et al., 2001). A IL-10 leva a produção de IgG1, IgG2 ou IgG3, mas na presença de IL-4 modula a produção de IgG4 ou IgE (JEANNIN et al., 1998), e em combinação com TGF $\beta$  resulta na secreção de IgA. A IL-10 também exerce ação estimuladora sobre outros tipos celulares, como as células T citotóxicas e as células NK.

Além dessas atividades, esta citocina está envolvida na indução da tolerância imunológica em nível periférico mediante a estimulação de subpopulações de células T reguladoras como Th3 e Tr1 (GROUX et al., 1996; KITANI et al., 2000).

O gene da interleucina 10 foi atribuído ao cromossomo 1 e localizado em 1q31-32 (ESKDALE et al., 1997), sendo constituído de cinco exons que são responsáveis pela codificação de uma cadeia polipeptídica de 160 aminoácidos. A análise da estrutura da IL-10, por meio de cristalografia de raios X, mostrou que duas destas cadeias se unem para formar um homodímero de 37 kDa. Os macrófagos constituem a principal fonte de IL-10, embora algumas subpopulações de células T (Th2, Th3, Tr1), células B, eosinófilos, mastócitos e outras células do sistema imune também produzam esta citocina. A expressão da IL-10 ocorre, em geral, após estimulação por fatores endógenos ou exógenos e é regulada por diferentes mecanismos nos diversos tipos celulares (MOORE et al., 2001; ASADULLAH et al., 2003).

As suas atividades biológicas, condizentes com uma citocina do tipo 2, são desencadeadas após a sua ligação com o seu receptor. Este é constituído de pelo menos duas subunidades, as cadeias alfa (IL-10R $\alpha$ ) e beta (IL-10R $\beta$ ), que são codificadas pelos

genes *IL10R1* e *IL10R2*, respectivamente (WALTER, 2002). A primeira é responsável pela ligação com a molécula de IL-10, e a segunda parece responsável pelo recrutamento da quinase TyK2 ao complexo de sinalização. O gene *IL10R1* apresenta uma expressão basal mais restrita às células hematopoéticas, sob estímulos ainda não tão bem compreendidos, enquanto o *IL10R2* mostra expressão constitutiva na maioria das células e dos tecidos analisados. A presença constante do IL-10R2 leva a crer que qualquer estímulo que induza a expressão de *IL10R1* torna uma célula respondedora à ação da IL-10.

A via de sinalização melhor caracterizada, após a ligação da IL-10 ao seu receptor, é a que ativa as quinases de tirosina JAK1 e TyK2 e os fatores de transcrição STAT3, STAT1 e STAT 5. Devido à complexidade funcional da IL-10, vias adicionais são provavelmente utilizadas para que as suas atividades biológicas sejam efetuadas nos diferentes tipos celulares. A IL-10 inibe a ativação do fator nuclear kapa B (NFkB) em monócitos, mas ativa os fatores AP-1 e NFkB em células T CD8+, o que está em conformidade com suas funções supressoras e estimuladoras nestes tipos celulares, respectivamente.

A região reguladora do gene *IL10* é bastante polimórfica e vinte e três mutações de ponto já foram identificadas. Dentre elas se incluem as posições -8571 (C→T), -8531 (G→A), -6752 (A→T), -6208 (G→C), -5402 (C→G), -3715 (A→T), -3575 (T→A), -3533 (A→T), -2849 (G→A), -2776 (A→G), -2769 (A→G), -2763 (C→A), -2739 (A→G), -2100 (C→A), -2050 (G→A), -2013 (A→G), -1349 (A→G), -1255 (C→T), -1082 (G→A), -851 (A→G), -819 (C→T), -657 (A→G), -592 (C→A) (TOUNTAS e COMINELLI, 1996; ESKDALE et al., 1997; TURNER et al., 1997; D'ALFONSO et al., 2000; GIBSON et al., 2001; KUBE et al., 2001). Além destes polimorfismos dialélicos, foram caracterizadas duas regiões distintas de microssatélites, constituídos de repetições de dinucleotídeos (CA), localizadas aproximadamente a 1,2 kb e a 4,0 kb a montante da posição inicial da transcrição, e denominadas *IL10.G* e *IL10.R*, respectivamente (ESKDALE e GALLAGHER, 1995; ESKDALE et al., 1996).

Na posição +78 do primeiro exon se encontra uma substituição de guanina por adenina, que corresponde à troca de glicina por arginina no códon 15 do provável peptídeo sinalizador da proteína; duas outras substituições foram identificadas nas posições +19 (C→T) e +953 (T→C) do terceiro intron, e ainda a presença de timina ao invés de citosina na posição +117 da região flanqueadora a jusante da região codificadora do gene (DONGER et al., 2001).

Investigações sobre a relevância funcional destes polimorfismos mostraram que os níveis de IL-10, após estimulação de células de sangue periférico com lipopolissacarídeo (LPS), variavam conforme os alelos presentes nos locos microssatélites *IL10.G* e *IL10.R*. Os haplótipos contendo o alelo *IL10.R3* estavam associados com secreção mais baixa do que aqueles contendo quaisquer outros alelos neste loco, enquanto o haplótipo *IL10.R2\_IL10.G14* apresentou a produção mais alta e o *IL10.R3\_IL10.G7* a menor produção desta citocina (ESKDALE et al., 1998). Outros polimorfismos do gene *IL10* que podem ser funcionalmente relevantes são os das posições -1082 (G→A) e -592 (C→A), que estão localizados em possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição, tais como: o Ets e STAT3, respectivamente (KUBE et al., 1995). Os efeitos destas posições, bem como o da posição -819 (C→T), foram investigados em células mononucleares de sangue periférico estimuladas com concanavalina A. Os resultados mostraram haver associação entre o haplótipo -1082 G \_ -819 C \_ -592 C e maior produção de IL-10, porém o alelo -1082 G parece ser o fator determinante do nível de produção desta citocina (TURNER et al., 1997). Estes resultados foram confirmados por CRAWLEY et al. (1999), que, além de avaliar a secreção de IL-10, investigaram o nível de transcrição de genes repórteres induzidos pelos diferentes haplótipos. Entretanto, foram observados resultados contraditórios com respeito aos genótipos e a produção de IL-10 (KEIJSERS et al., 1997; GIBSON et al., 2001).

Quanto à parte mais distal da região reguladora, os polimorfismos que parecem influir na produção de IL-10 são os das posições -3575 e -2763, que estão localizados em supostos sítios de ligação do Pit-1 e de fatores específicos de linfócitos e células mielóides, respectivamente (GIBSON et al., 2001). Segundo estes autores, o haplótipo de *IL10* -3575 T \_ -2849 G \_ -2763 C está associado com maior produção e os haplótipos -3575 A \_ -2849 G/A \_ -2763 A com menor produção de IL-10.

Devido à amplitude de atividades biológicas da IL-10, níveis alterados de sua expressão têm sido implicados na fisiopatologia de doenças infecciosas, de doenças atópicas como a dermatite e a asma alérgica, de vários tipos de neoplasias e doenças auto-imunes (BEEBE et al., 2002; ASADULLAH et al., 2003). Algumas patologias são associadas com a sua expressão exacerbada, por exemplo, o lupus eritematoso sistêmico e linfoma, enquanto outras estão relacionadas à sua deficiência, como a psoríase e a doença inflamatória do intestino. Conforme as circunstâncias, a IL-10 exerce atividade imunossupressora ou intensifica as respostas imunes e inflamatórias, mas os fatores que

determinam quais atividades da IL-10 serão dominantes durante uma resposta imunológica não são claros. A compreensão dos mecanismos subjacentes a este fenômeno é importante para ampliar a utilização da IL-10 ou de seus antagonistas como agentes terapêuticos, embora a administração de IL-10 recombinante já tenha sido testada em alguns ensaios clínicos (ASADULLAH et al., 2003).

Muitos estudos têm avaliado a influência da variabilidade genética da região promotora do gene *IL10* na suscetibilidade ou modulação de doenças. O genótipo A/A do nucleotídeo -1082, associado com baixa produção de IL-10, parece conferir suscetibilidade à infecção pelo vírus Epstein-Barr (HELMINEN et al., 1999), às doenças inflamatórias do intestino (TAGORE et al., 1999) e à forma mais avançada e pior prognóstico de melanoma cutâneo maligno (HOWELL et al., 2001). O haplótipo -1082 A \_ -819 T \_ -592 A mostrou associação com manifestação oligoarticular extensa da artrite reumatóide juvenil (CRAWLEY et al., 1999). Por meio da análise de haplótipos estendidos, incluindo os polimorfismos mais distais -3575, -2849 e -2763 e os proximais -1330, -1082, -819 e -592, foram observadas associações entre aqueles que determinam produção elevada de IL-10 e a suscetibilidade ao lupus eritematoso sistêmico (GIBSON et al., 2001).

## 1.7 MARCADORES MICROSSATÉLITES NA IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE SUSCETIBILIDADE A DOENÇAS

O genoma humano contém um elevado número de microssatélites, que são repetições em tandem formadas por motivos de seqüências curtas denominadas STR (*Short Tandem Repeats*), cujos comprimentos variam de dois a seis pares de bases de DNA. Segundo HANCOCK (1999), entre os dinucleotídeos, as repetições CA ocorrem com freqüência duas vezes mais elevada do que as repetições AT, e três vezes em relação às repetições AG. As seqüências CAG e AAT parecem ser as repetições de trinucleotídeos mais comuns. Apesar de os microssatélites estarem presentes em todo o genoma, e distribuídos de forma relativamente uniforme, pois se encontra um microssatélite a cada dois mil pares de bases, há uma sub-representação nas regiões codificadoras (LANDER et al., 2001).

O significado biológico dos microssatélites ainda não é bem conhecido, embora estejam sendo acumuladas evidências de que estas seqüências são de relevância funcional tanto para a regulação da transcrição quanto para a função dos produtos gênicos (KASHI et

al., 1997; KASHI e SOLLER, 1999). Por exemplo, um microssatélite da região promotora do gene da insulina, que inicialmente foi identificado apenas como marcador de suscetibilidade à diabetes melito do tipo I, posteriormente teve as suas próprias variantes alélicas associadas com a regulação do nível de transcrição gênica (BENNETT et al., 1995). Também são dignos de menção os trinucleotídeos que se localizam nas seqüências codificadoras, cujas expansões estão associadas com doenças genéticas neurodegenerativas como a síndrome do X frágil e a doença de Huntington, entre outras (SUTHERLAND e RICHARDS, 1995). Estas doenças apresentam o fenômeno da antecipação, segundo o qual a idade do estabelecimento dos sintomas clínicos da doença tende a diminuir a cada geração, enquanto os alelos dos microssatélites tendem a aumentar o seu número de repetições.

Independentemente da sua relevância funcional, os microssatélites são marcadores genéticos muito úteis nos estudos de genética de população e no mapeamento de genes envolvidos na patogênese de doenças, devido ao seu alto grau de polimorfismo, a sua alta densidade no genoma e por serem transmitidos de acordo com os padrões mendelianos de herança.

Várias doenças, particularmente as auto-imunes, têm sido associadas a genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH). Muitas destas associações são com os genes que codificam as moléculas HLA de classes I ou II, responsáveis pela interação com peptídeos antigênicos e pela sua apresentação ao receptor das células T (PRICE et al., 1999). O CPH é a região mais polimórfica e que apresenta a maior densidade de genes do genoma humano, sendo constituído de 224 genes e pseudogenes ao longo de uma extensão de 3600 kilobases no braço curto do cromossomo seis (6p21.3) (BECK e TROWSDALE, 2000). Estima-se que as funções de cerca de 40% destes genes estejam relacionadas à resposta imunológica, o que sugere fortemente o envolvimento de outros genes, além dos que codificam as moléculas HLA, na patogênese de diversas doenças auto-imunes, infecciosas e neoplásicas.

Muitos locos microssatélites foram mapeados no CPH e em regiões que flanqueiam este complexo, e após a conclusão do seqüenciamento da sua extensão total aumentou consideravelmente a densidade de marcadores potencialmente úteis no mapeamento fino de locos de doenças complexas. Dentre estes locos, vários já foram bem caracterizados e avaliados quanto ao seu grau de polimorfismo (MARTIN et al., 1998; TAMIYA et al., 1999; MATSUZAKA et al., 2000; 2001). As informações sobre estes microssatélites têm sido compiladas e atualizadas por FOISSAC et al. (1998; 2000). Mais recentemente, CULLEN et al. (2003) analisaram a variabilidade de diversos STR, inicialmente

localizados por programa computacional, e identificaram vários novos locos polimórficos distribuídos ao longo do CPH, embora muitos deles ainda requeiram caracterização adicional antes de sua utilização como marcadores nos estudos de associação com doenças.

O mapeamento de genes responsáveis pelas doenças complexas, empregando-se marcadores genéticos, pode ser realizado por meio de estudos de associação. O método clássico é o do estudo de associação caso-controle, que é realizado em nível de população. Ele requer alguns cuidados para evitar a identificação de associações espúrias que podem ser decorrentes de artefatos de estatística, da estratificação da população ou de controles inadequados. Para evitar estes problemas, deve-se aplicar correções adequadas aos testes estatísticos, selecionar cuidadosamente os controles, observando o pareamento entre estes e os pacientes com respeito à etnia, origem geográfica e exposição aos supostos fatores ambientais quando pertinente. Alguns métodos que superam certos problemas encontrados no estudo caso-controle foram desenvolvidos. Dentre eles se inclui o teste do desequilíbrio de transmissão (TDT = *Transmission Disequilibrium Test*), que é considerado um estudo de associação com controle interno por contornar o problema da estratificação da amostra. Portanto, a habilidade de detectar um loco de predisposição à doença, utilizando como referência um loco marcador e um método de associação, depende da extensão do desequilíbrio de ligação entre ambos.

Numerosos estudos que utilizam microssatélites como marcadores genéticos têm possibilitado a identificação de genes de predisposição a vários tipos de doenças monogênicas e complexas. Por exemplo, emprego de microssatélites levou à localização da posição relativa do gene da hemocromatose (RAHA-CHOWDHURY et al., 1995). Podemos mencionar, dentre vários outros estudos, o da diabetes melito do tipo I, que evidenciou a presença de pelo menos mais um gene de predisposição (LIE et al., 1999) no CPH, e o da artrite reumatóide, que corroborou a existência de um segundo loco de suscetibilidade localizado na região entre o loco microssatélite denominado *TNFA* e o loco *HLA-B* (PASCUAL et al., 2002), além dos já conhecidos genes de classe II associados a estas doenças.

É importante ressaltar que o desequilíbrio de ligação, entre as variantes alélicas dos genes localizados dentro do Complexo Principal de Histocompatibilidade, assim como em outras regiões do genoma, dificulta a identificação de genes adicionais que estejam envolvidos na patogênese das doenças previamente associadas a variantes dos genes *HLA*. Nestes casos pode-se empregar a estratificação da amostra de acordo com a presença e a ausência dos alelos dos quais já se sabe estarem associados, para facilitar a identificação de outros locos de proteção ou suscetibilidade.

## 2 OBJETIVOS

O pênfigo foliáceo endêmico é uma doença auto-imune complexa decorrente de interações entre fatores genéticos e ambientais. Apesar de alelos dos genes *HLA-DRB1* e *DQB1* terem sido os únicos fatores genéticos cujas associações foram bem demonstradas, variantes alélicas de outros genes devem estar envolvidas na suscetibilidade a esta doença. Os genes que codificam as citocinas constituem fortes candidatos devido às suas funções imunomoduladoras. Além disso, ao lado dos genes *HLA*, outros localizados no Complexo Principal de Histocompatibilidade também estão envolvidos na regulação das respostas imunes e inflamatórias, e podem participar no desenvolvimento da auto-imunidade patogênica do pênfigo foliáceo endêmico.

O PFE é uma doença mórbida e socialmente estigmatizada. Os tratamentos atualmente disponíveis se baseiam em imunossupressão generalizada, cujos riscos, por si só, justificam as pesquisas que possam contribuir para a descoberta dos mecanismos imunes e dos fatores genéticos de suscetibilidade subjacentes à sua patogênese. Somente este conhecimento possibilitará o emprego de estratégias profiláticas ou terapêuticas baseadas na modulação específica da auto-reatividade nestes pacientes. Levando isto em consideração, o presente estudo, que faz parte de um projeto amplo que visa dissecar o componente genético de suscetibilidade ao PFE, tem os seguintes objetivos:

- Pesquisar se a variabilidade dos genes de determinadas citocinas exerce alguma influência na suscetibilidade ao pênfigo foliáceo endêmico.
  - Investigar se existe associação entre alelos e/ou genótipos dos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4*, *IL4R*, *IL6* e *IL10* e o pênfigo foliáceo endêmico.
  - Investigar se existe associação entre os haplótipos dos genes do complexo *IL1* e o pênfigo foliáceo endêmico.

- Investigar se existe associação entre os haplótipos das variantes polimórficas do gene *IL10* e o pênfigo foliáceo endêmico.
- Investigar se existe algum tipo de interação entre os genes estudados, caso sejam identificadas associações entre suas variantes e o PFE.
- Pesquisar se a variabilidade da região reguladora do gene *TNF*, localizada a montante da posição -1031, está envolvida na suscetibilidade ao pênfigo foliáceo endêmico.
  - Realizar o seqüenciamento de um segmento de DNA a montante da posição -1031 do gene *TNF*, ainda não investigada quanto à variabilidade genética, com o objetivo de identificar polimorfismos ainda não descritos nesta região.
  - As variantes dos novos polimorfismos, se estes forem encontrados, serão investigadas para possíveis associações com PFE, desde que apresentem frequências adequadas a um marcador genético.
- Identificar outras regiões do Complexo Principal de Histocompatibilidade que possam conter genes envolvidos na patogênese do pênfigo foliáceo endêmico.
  - Investigar se existe associação entre as variantes de locos de microssatélites do CPH e o PFE. Os seguintes marcadores microssatélites foram selecionados: *D6S273*, *D6S291*, *TAP1CA*, *D6S276*, *G51152*, *D6S265*, *MIB*, *RING3CA* e *MOGCA*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA

Amostras de sangue periférico de pacientes com diagnóstico de pênfigo foliáceo e de indivíduos-controle foram coletadas no Hospital Adventista do Pênfigo, em Campo Grande, MS. Esta coleta foi realizada em quatro visitas da equipe da Professora Maria Luiza Petzl-Erler ao Hospital Adventista do Pênfigo e em colaboração com o Dr. Alfredo Marquart Filho, dermatologista daquele hospital. O diagnóstico de PFE foi fundamentado em exame clínico dos pacientes e, em casos de dúvida, complementado com exame histopatológico.

Dentre os indivíduos pertencentes à amostra inicial (168 pacientes e 189 controles), foram escolhidos 150 pacientes e 160 controles com o objetivo de constituir uma amostra total pareada quanto à etnia. Os indivíduos incluídos nas subamostras caucasóide (80 pacientes e 120 controles) e negróide (62 pacientes e 61 controles) foram obtidos da amostra inicial. Os pacientes e controles da amostra inicial foram tipificados para as variantes alélicas dos genes *IL4*, *IL4R*, *IL6*, *IL10* e para os locos microssatélites *D6S265*, *D6S273*, *D6S276*, *D6S291*, *G51152*, *MIB*, *MOGCA*, *RING3CA* e *TAPICA*. Para os genes *IL1RN*, *IL1A* e *IL1B*, somente uma subamostra de caucasóides (50 pacientes e 52 controles) foi tipificada. Sempre que o número de indivíduos analisados para as variantes de um determinado gene ou loco microssatélite diferiu dos números mencionados, tanto para a amostra total quanto para as subamostras, isso se deveu a problemas técnicos ou à má qualidade de algumas amostras de DNA.

Quanto à etnia, a amostra de pacientes é constituída de caucasóides brasileiros (53,3%), mestiços de caucasóides com índios (3,3%), índios (2,0%) e negróides (41,4%). O grupo classificado como negróide inclui mulatos claros, médios, escuros e negros. Os controles foram selecionados de modo a constituir um grupo com composição étnica similar à de pacientes, sendo formado por 56,9% de caucasóides brasileiros, 3,1% de mestiços de caucasóide com índio, 1,9% de índios e 38,2% de negróides. Um outro critério de escolha foi o de incluir indivíduos residentes em áreas

endêmicas e que, portanto, supostamente apresentavam possibilidades semelhantes às dos pacientes de exposição aos fatores ambientais. Muitos desses controles foram recrutados por ocasião da coleta de sangue dos pacientes por se tratarem de acompanhantes não consangüíneos.

Em sua maioria, os pacientes e os controles trabalhavam ou haviam trabalhado em área rural. Alguns deles, apesar de residirem em áreas urbanas, tinham contato com o ambiente rural devido ao hábito da pesca ou pela visitação freqüente a familiares que residiam em área rural. O grau médio de escolaridade dos indivíduos da amostra é baixo, sendo que 72,7% dos pacientes e 68,1% dos controles eram analfabetos ou não concluíram o ensino fundamental.

Com respeito à idade de manifestação da doença, 24,0% dos pacientes apresentaram sintomas clínicos entre quatro e dezoito anos de idade; 25,3%, entre dezenove e trinta anos; 38,0%, entre trinta e um e cinquenta anos e 10,7%, após a quinta década de vida. Para 2,0% dos pacientes não foi possível obter esta informação. A maior parte dos pacientes era oriunda de Mato Grosso do Sul (72,0%), outros do Mato Grosso (5,3%), do Paraná (4,0%), de Rondônia (2,0%), de Minas Gerais (2,0%) e os demais (14,7%) de outras regiões do país. Quando manifestaram a doença, 72,0% dos pacientes residiam no estado de Mato Grosso do Sul, 5,3% no Mato Grosso, 4,0% no Paraguai, 4,0% no Paraná, 2,0% em Rondônia, 2,0% em Minas Gerais, 2,0% em São Paulo, 1,3% em Goiás, 1,3% no Espírito Santo, 0,7% no Acre, 0,7% no Distrito Federal e 4,7% deles não sabia informar o local de residência quando houve a manifestação clínica do PFE. Com respeito aos controles, na ocasião da averiguação, 68,8% eram residentes no Mato Grosso do Sul, 22,5% no Paraná, 1,9% no Mato Grosso, 1,3% em Rondônia, 1,3% em São Paulo, 0,6% em Minas Gerais e 0,6% em Santa Catarina. Esta informação não foi obtida em 3,1% dos controles.

Na época da averiguação, a idade média dos pacientes com PFE foi de  $42,5 \pm 18,2$ , variando entre 10 e 88 anos, e a dos controles foi de  $48,3 \pm 15,3$ , variando de 19 a 86 anos. A proporção sexual entre os pacientes foi de 77 mulheres (51,3%) e 73 homens (48,7%); entre os controles, havia 67 mulheres (41,9%) e 93 homens (58,1%).

Todos os indivíduos incluídos nesse estudo assinaram um termo de consentimento informado após terem recebido explicações sobre os objetivos da pesquisa. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

### 3.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico de sangue periférico foi obtido por outros participantes do projeto “Identificação de genes de suscetibilidade ao pênfigo foliáceo endêmico (Fogo Selvagem)”, do Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. O DNA de uma parte da amostra foi isolado por um método de *salting-out* que emprega o detergente NONIDET P-40 (LAHIRI e NURNBERGER Jr., 1991); e as demais amostras pelo método do fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

### 3.3 TIPIFICAÇÃO DE SNP PELO MÉTODO DA PCR-RFLP

A genotipificação de alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNP = *Single Nucleotide Polymorphisms*) presentes nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4*, *IL6* e *IL10* foi realizada pelo método de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism*). Dentre os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR, de aqui em diante denominados apenas iniciadores, alguns foram projetados com substituições de bases que criam falhas de pareamento em uma ou mais posições com as seqüências-alvo genômicas (TSENG et al., 2002a; 2002b). Essas alterações da seqüência de bases têm o objetivo de introduzir sítios de restrição das endonucleases, na presença de alelos específicos. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Imunogenética do Fred Hutchinson Cancer Research Center, EUA, sob a chefia do Professor Dr. John A. Hansen.

#### 3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações foram realizadas num volume total de 10µl contendo tampão 10x (Tris-HCl 10mM pH 8,3, KCl 50mM), desóxi-ribonucleotídeos (dNTP) 0,2mM (cada), MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, 8 a 16 pmoles de cada iniciador acrescidas de 0,25 e 0,5 unidade da *AmpliTaq Gold DNA Polimerase* (Applied Biosystems) para PCR simples e multiplex, respectivamente (tabela 1). Alguns pares de iniciadores foram combinados em PCR multiplex, e outros utilizados isoladamente, dependendo dos tamanhos dos fragmentos gerados posteriormente pelas enzimas de restrição (tabela 2). As seqüências dos iniciadores específicos para os segmentos de DNA que incluem os polimorfismos *IL1A* -889, *IL1B* -

511, *IL1B* +3954, *IL1RN* nucleotídeo 9261, *IL4* -590, *IL4R* nucleotídeo 148, *IL6* -174, *IL10* -592 e *IL10* -1082 estão listadas na tabela 2; com exceção das seqüências dos iniciadores utilizados para amplificar os segmentos dos genes *IL4* e *IL4R*, que foram selecionadas para este estudo, as demais seqüências foram as descritas por TSENG et al. (2002a; 2002b). A solução da PCR, contendo aproximadamente 10ng da amostra de DNA, foi submetida a 40 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (56°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 60 segundos) em termociclador da Applied Biosystems (PE 9600).

### 3.3.2 Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

A detecção dos SNP dos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4*, *IL4R*, *IL6* e *IL10*, por meio da análise dos fragmentos de restrição, foi realizada mediante a mistura de 2µL da solução do DNA amplificado com 3 a 6 unidades da endonuclease de restrição apropriada, em tampão e temperatura recomendados pelo fabricante (New England Biolabs Inc.) ou de acordo com modificações descritas na tabela 3.

Os produtos da digestão (6µL) foram misturados com aproximadamente 1 a 2µL do tampão de carregamento (Invitrogen Life Technologies 10816-015) e submetidos à eletroforese em gel de agarose (ultrapurificada ou tipo II) 3 a 4% contendo brometo de etídeo (5µL de brometo de etídeo 10mg/mL para cada 100mL). O tampão TBE 1X (10,8g de Tris-HCl, 5,5g de ácido bórico, 4 mL de EDTA dissódico 0,5M pH 8,0 em quantidade suficiente de água para 1000mL) foi utilizado tanto para o preparo dos géis quanto para a corrida eletroforética, em geral a 100 V e por tempo suficiente para haver nítida separação das bandas. A primeira e a última cavidade do gel foram carregadas com marcador de peso molecular constituído de 11 fragmentos, variando de 72 a 1353 pares de bases, resultantes da digestão do ΦX174 pela endonuclease *HaeIII* (Invitrogen Life Technologies 10383-016). As bandas do marcador molecular foram utilizadas para facilitar a identificação do tamanho dos fragmentos específicos presentes em cada amostra submetida à análise por PCR-RFLP.

Os géis de agarose foram fotografados para possibilitar a análise dos fragmentos, que permitem a identificação das variantes polimórficas presentes em cada amostra de DNA, após a digestão com as respectivas enzimas de restrição (tabela 4).



TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES POLIMÓRFICAS DOS GENES DAS INTERLEUCINAS PARA ANÁLISE POR RFLP

Gene	Polimorfismo	Variantes Alélicas	Número GenBank	Oligonucleotídeos Iniciadores	Seqüências	Posição dos Iniciadores na seqüência do GenBank
<i>IL1A</i>	-889	C, T	X03833	IL1Af6 IL1Ar6	5' gac taa aac tct ggg cct caa gtg 3' 5' ggc atg gat ttt tac at <b>C CAa</b> gcc ttc aat g 3'	311 - 334 580 - 550
<i>IL1B</i>	-511	C, T	X04500	IL1B.1 IL1B.2	5' gct cct gca att gac aga <b>Cag</b> ctc c 3' 5' gtt tag gaa tct tcc cac tt 3'	1398 - 1422 1536 - 1517
<i>IL1B</i>	+3954	C, T	X04500	IL1B3.1 IL1B4.1	5' tag tgt cag gtc cag tgt tc 3' 5' gca tgc tgc aca taa gcc tc 3'	5696 - 5715 5922 - 5903
<i>IL1RN</i>	nt 9261	A, G	X64532	IL1Ra1.1 IL1Ra2.1	5' gta gtg tgc ttg gtt t <b>Ca</b> <b>Gct</b> tct 3' 5' gtc ccc aca aaa cta aaa tcc cga ggt c 3'	9237 - 9260 9330 - 9303
<i>IL4</i>	-590	C, T	M 23442	IL4e1.1 IL4 b	5'gac ctg tcc ttc tca aaa cac taa act tgg gag a <b>Cc</b> att g 5'ggt gta atg cag tcc tcc tg	541 - 580 774 - 755
<i>IL4R</i>	nt 148	A, G	AC 004525	IL4R 1.5 IL4R 2.4	5'cct gtg tct gca gag ccc a <b>Ga</b> cgt gt 3' 5'ttc ca <b>G</b> ag <b>T</b> agc tgc tgc cca g 3'	94298 - 94273 94160 - 94181
<i>IL6</i>	-174	G, C	AF048692	IL6fBs1I IL6rBs1I	5' ttg tca aga cat gcc aaa gtg c <b>Gg</b> ag 3' 5' gtg caa tgt gac gtc c <b>Ct</b> tag cat 3'	346 - 371 501 - 478
<i>IL10</i>	-1082	A, G	U06844	IL10 af IL10 ar	5' aac act act aag gct <b>Cct</b> ttg gga 3' 5' caa gga aaa gaa gtc agg att cca tgg a 3'	256 - 279 357 - 330
<i>IL10</i>	-592	A, C	U06844	IL10bf IL10br	5' ggt gag cac tac ctg act ag 3' 5' act ttc cag aga ctg gc <b>C</b> tcc tac ag 3'	594 - 613 796 - 771

Obs: as bases com letra maiúscula e em negrito foram intencionalmente substituídas segundo as estratégias empregadas por Tseng et al. (2002a; 2002b). A escolha dos oligonucleotídeos iniciadores que apresentam falhas de pareamento com as seqüências genômicas tem o objetivo de introduzir sítios de restrição, na presença de alelos específicos, das endonucleases utilizadas na análise de RFLP.

TABELA 3 - PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DOS GENES *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4*, *IL4R*, *IL6* e *IL10* POR MEIO DE RFLP

Solução para RFLP	RFLP Simples <i>IL1A-889</i>	RFLP Triplex		RFLP duplex <i>IL10 - 592</i> <i>IL10 -1082</i>	RFLP Duplex <i>IL4 -590</i> <i>IL4R nt 148</i>
		<i>IL1B +3954</i> <i>IL1B -511</i> <i>IL1RN nt 9261</i>	RFLP Simples <i>IL6 -174</i>		
Água ultrapura	3,1µL	2,74µL	3,1µL	3,1µL	3,04µL
Endonuclease de Restrição (NEB)	<i>Xcm</i> I (cat. R0533) 0,3µL (3 U)	<i>Taq</i> <sup>a</sup> I (cat. R0149) 0,3µL (6 U) <i>Alw</i> NI (cat. R0514) 0,3µL (3 U)	<i>Bsl</i> I (cat. R0555) 0,3µL (3 U)	<i>Bsl</i> I (cat. R0555) 0,3µL (3 U)	<i>Psh</i> A I (cat. R0593) 0,3µL (3 U)
Tampões 2, 3 ou 4 (NEB) <sup>a,b,c</sup>	Tampão 2 ou Tampão 4 0,6µL	Tampão 4 0,6µL	Tampão 3 ou Tampão 4 0,6µL	Tampão 3 ou Tampão 4 0,6µL	Tampão 4 0,6µL
Soroalbumina Bovina (SAB) NEB cat. B9001	não requer SAB	Suplementar o tampão 4 com 100µg de SAB/mL: 0,06µL por reação	não requer SAB	não requer SAB	Suplementar o tampão 4 com 100µg de SAB/mL: 0,06µL por reação
DNA Amplificado	2µL	2µL	2µL	2µL	2µL
Temperatura e tempo de incubação	37°C por 2 horas em tampão 2 ou 37°C durante a noite em tampão 4	37°C durante a noite ou 2 horas a 37°C seguidas de mais 2 horas a 65°C.	55°C por 2 horas em tampão 3 ou 37°C durante a noite em tampão 4	55°C por 2 horas em tampão 3 ou 37°C durante a noite em tampão 4	37°C por 2 horas
Eletroforese em gel de agarose (em TBE 0,5X)	Agarose 3,5 ou 4%	Agarose 3,5 ou 4%	Agarose 3%	Agarose 3%	Agarose 3%

<sup>a</sup> Tampão 2: NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotreitól 1 mM (pH 7.9 a 25°C). New England Biolabs - catálogo B7002.

<sup>b</sup> Tampão 3: NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotreitól 1 mM (pH 7.9 a 25°C). New England Biolabs - catálogo B7003.

<sup>c</sup> Tampão 4: acetato de potássio 50 mM, Tris-acetato 20 mM, acetato de magnésio 10 mM, ditiotreitól 1 mM (pH 7,9 a 25°C). New England Biolabs - catálogo B7004.

TABELA 4 - ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO E FRAGMENTOS GERADOS APÓS DIGESTÃO DOS PRODUTOS DA PCR DOS GENES *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4*, *IL4R*, *IL6* e *IL10*

Gene	Polimorfismo	Variantes Alélicas	Oligonucleotídeos Iniciadores (par)	Fragmento Amplificado (pb)	Endonuclease de Restrição	Fragmentos de Restrição (pb)
<i>IL1A</i>	-889	C, T	IL1Af6/IL1Ar6	270	<i>XcmI</i> cliva alelo C	<b>246</b> e 24
<i>IL1B</i>	-511	C, T	IL1B.1/IL1B.2	139	<i>AlwNI</i> cliva alelo T	<b>118</b> e 21
<i>IL1B</i>	+3954	C, T	IL1B3.1/IL1B4.1	227	<i>TaqI</i> cliva alelo C	<b>194</b> e 33
<i>IL1RN</i>	nt 9261	A, G	IL1Ra1.1/IL1Ra2.1	94	<i>AlwNI</i> cliva alelo G	<b>75</b> e 19
<i>IL4</i>	- 590	T, C	IL4e1.1/IL4b	234	<i>PshAI</i> cliva alelo C	<b>197</b> e 37
<i>IL4R</i>	nt 148	A, G	IL-4R1.5/IL4R2.4	139	<i>PshAI</i> cliva alelo G	<b>115</b> e 21
<i>IL6</i>	-174	G, C	IL-6fBs1/IL6rBs1I	156	<i>BsII</i> cliva alelo C	<b>117</b> , 20 e 19
<i>IL10</i>	-1082	A, G	IL10af/IL10ar	102	<i>BsII</i> cliva alelo G	<b>83</b> e 19
<i>IL10</i>	-592	A, C	IL10bf/IL10br	203	<i>BsII</i> cliva alelo C	<b>183</b> , 11 e 9

Obs: somente os fragmentos de restrição maiores (em negrito) são visualizados, após a corrida eletroforética dos produtos da PCR digeridos, em gel de agarose sob as condições padronizadas. pb = pares de bases

### 3.4 TIPIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO *IL6* -174 PELO MÉTODO DA PCR-SSO

Todas as tipificações das variantes do polimorfismo -174 do gene *IL6*, inicialmente realizadas pelo método da PCR-RFLP, foram confirmadas pelo método da PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probes*) segundo os procedimentos descritos por BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA (1997). Os iniciadores para a amplificação do fragmento contendo a posição polimórfica -174 foram IL6SSOFOR (5' ttg tca aga cat gcc aaa gtg ctg ag 3') e IL6SSOREV (5' gtg caa tgt gac gtc ctt tag cat 3'). As sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridização dos fragmentos de DNA amplificados pela PCR foram *IL6* -174G (5' gtc ttg cga tgc taa 3') e *IL6* -174C (5' gtc ttg cca tgc taa 3'), as quais são específicas para as seqüências das variantes G e C, respectivamente. As seqüências dos iniciadores e das sondas foram selecionadas especialmente para este estudo. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

### 3.5 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO REGULADORA DO GENE *TNF*

A determinação da seqüência de bases de DNA da região reguladora do gene *TNF* teve como objetivo identificar novos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), uma vez que o fragmento do DNA mais a montante ainda não havia sido investigado quanto à variabilidade genética. Foi realizado o seqüenciamento direto (GUILLAUMEUX et al., 1998) desta região em trinta e oito células de referência de Workshops Internacionais de Histocompatibilidade (WIH). As seguintes células (MARSH et al., 1997) foram analisadas: 9004, 9005, 9010, 9015, 9016, 9022, 9023, 9030, 9031, 9032, 9033, 9035, 9036, 9038, 9039, 9040, 9042, 9043, 9044, 9047, 9048, 9049, 9050, 9051, 9052, 9060, 9061, 9062, 9063, 9064, 9065, 9068, 9069, 9072, 9084, 9092, 9096 e 9098. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Imunogenética do Fred Hutchinson Cancer Research Center, EUA, sob a chefia do Professor Dr. John A. Hansen.

#### 3.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Uma extensão de 2121 pares de bases (pb) incluindo a região reguladora do gene

*TNF*, entre as posições de números 68272 e 70392 da seqüência de referência do *GenBank* (AP000505), foi amplificada com três pares de iniciadores selecionados especialmente para este estudo: HTNFabF1(5'ttt cag tgc tca tgg tgt cct ttc c 3') e HTNFabR1 (5' gct tgt ccc tgc tac ccc cac 3'); HTNFabF2 (5' gag gct gaa ccc cgt ccc c 3') e HTNFabR2b (5' gga atg gag gga ggg aca gag g 3'); e HTNFabF3 (5'gta acc cat tcc tca gag ccg c 3') e HTNFabR3 (5' ggc atc ccc cac cta gtc ctc a 3'). Estas amplificações resultaram nos três seguintes fragmentos, com sobreposição de cerca de 200 a 300 pares de bases (pb):

Oligonucleotídeos Iniciadores	Seqüência de referência do <i>GenBank</i> (AP000505)	Tamanho do Fragmento Amplificado
HTNFabF1/abR1	68272 a 69049	778 pb
TNFabF2/abR2b	68755 a 69647	893 pb
HTNFabF3/abR3	69407 a 70392	986 pb

As reações foram realizadas separadamente, uma para cada par de iniciadores, num volume total de 25 $\mu$ L contendo: Tris-HCl 10mM pH 8,3, KCl 50mM, desóxi-ribonucleotídeos (dNTP) 0,1mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, betaína 1M (Sigma-Aldrich), 5 picomoles de cada iniciador e 1,25 unidade da *Taq* DNA Polimerase (Roche).

A solução da PCR, contendo aproximadamente 50ng de DNA, foi submetida à amplificação em termociclador da Applied Biosystems (PE 9700), de acordo com as seguintes condições: uma etapa de 94°C durante 5 minutos, seguida por 10 ciclos de desnaturação (94°C por 20 segundos), anelamento (65°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos), e de mais 25 ciclos de desnaturação (94°C por 20 segundos), anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos), e para finalizar uma etapa de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram testados para amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Após, os produtos foram mantidos a 2 - 4°C quando utilizados no mesmo dia ou a -20°C se armazenados por tempo mais prolongado.

### 3.5.2 Purificação com Fosfatase Alcalina e Exonuclease I

Os produtos resultantes das PCRs foram tratados com Exo-SAP-IT (Amersham Biosciences US71949), que é uma solução contendo as enzimas fosfatase alcalina de

camarão e exonuclease I, para remover o excesso de dNTP e de oligonucleotídeos iniciadores. A mistura de 10 $\mu$ L do DNA amplificado com 5 $\mu$ L do Exo-SAP-IT foi submetida, em termociclador da Applied Biosystems (PE 9700), à temperatura de 37°C por 15 minutos, a seguir à temperatura de 80°C por 15 minutos, e mantida a 2 - 4°C quando utilizada no mesmo dia ou a -20°C se armazenada por tempo mais prolongado.

### 3.5.3 Reação de Seqüenciamento

Após esta purificação, os produtos de PCR foram submetidos às reações de seqüenciamento, utilizando a química do “*BigDye Terminator* versão 2.0” (Applied Biosystems 4314415). A solução das reações de seqüenciamento, uma para cada fita de DNA (*sense* e *nonsense*), foi preparada com 8 $\mu$ L da solução do DNA purificado, 4 $\mu$ L de iniciadores (específicos para cada fita) e 8 $\mu$ L da mistura da reação. Essa mistura é fornecida, pronta para uso, no kit “*BigDye Terminator*” e é constituída de *AmpliTaq FS*, didesóxi-ribonucleosídeos trifosfatados (ddNTP) marcados com fluoróforos (*BigDye Terminators*), cloreto de magnésio e tampão. As reações de seqüenciamento foram realizadas em termociclador da Applied Biosystems (PE 9700), com as seguintes condições de ciclagem: 1 etapa a 95°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos a 95°C por 5 segundos, 50°C por 10 segundos, 60°C por 4 minutos. Os produtos resultantes foram mantidos a 4°C quando utilizados no mesmo dia ou a -20°C quando estocados por período mais longo.

### 3.5.4 Purificação com Etanol

A precipitação dos fragmentos de DNA resultantes da reação de seqüenciamento foi efetuada pela adição, em cada cavidade da placa para 96 reações, de 16 $\mu$ L de água ultra purificada e 64 $\mu$ L de etanol 95% não desnaturado. A placa foi selada com fita adesiva, misturada por inversão e deixada em repouso por quinze minutos à temperatura ambiente para precipitar os ácidos desóxi-ribonucléicos. Foi submetida à centrifugação a 2.000g por 30 minutos e o sobrenadante descartado pela inversão da placa sobre papel absorvente. A seguir, a placa foi centrifugada por 1 minuto a 50g seguida da adição de 150 $\mu$ L de etanol 70% a cada botão (precipitado) de DNA e submetida à mistura por inversão. Foi novamente centrifugada a 3000g por 10 minutos. Após remoção da fita adesiva a placa foi invertida sobre papel absorvente e centrifugada a 50g por um minuto. Esta etapa, seguida de inversão da placa para descarte do sobrenadante, foi repetida mais uma vez. A placa,

depois de selada, foi mantida no escuro entre 2°C e 4°C para uso no mesmo dia ou a -20°C quando armazenada por tempo mais prolongado.

### 3.5.5 Eletroforese em Seqüenciador ABI PRISM® 3700

Após a etapa de purificação foram adicionados aos precipitados de DNA, em cada cavidade da placa de 96 reações, 10µL de formamida purificada (Applied Biosystems 4311320). A seguir a placa foi colocada em termociclador (Applied Biosystems PE 9700) a 95°C durante 2min e 30seg para desnaturação das amostras. Este procedimento foi realizado próximo ao momento de as amostras de DNA serem submetidas à eletroforese nos capilares do seqüenciador ABI PRISM® 3700. A interpretação dos resultados foi realizada com auxílio do programa para análise de seqüenciamento de DNA (ABI PRISM® Sequencing Analysis Software™).

Informações sobre os procedimentos de calibração e manuseio desse equipamento e do programa para análise de seqüenciamento de DNA são obtidas por meio dos manuais do usuário e do apoio técnico providos pelo fabricante ([www.appliedbiosystems.com.br](http://www.appliedbiosystems.com.br)).

## 3.6 TIPIFICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES POR SISTEMA DE ELETROFORESE DE DNA EMPREGANDO OLIGONUCLEOTÍDEOS MARCADOS COM FLUORÓFOROS

O método utilizado para a tipificação de nove microssatélites, alguns localizados no Complexo Principal de Histocompatibilidade e outros flanqueando esta região (figura 3), foi a amplificação por meio da PCR, com oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluoróforos, seguida da separação dos fragmentos amplificados em gel desnaturante em seqüenciador ABI PRISM®377 (MARTIN et al., 1998). Os dados foram coletados e analisados com auxílio do programa ABI PRISM® Genescan 2.1, e os alelos designados por meio do programa ABI PRISM® Genotyper 2.0. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Imunogenética do National Cancer Institute, EUA, sob a chefia da Dra. Mary Carrington.

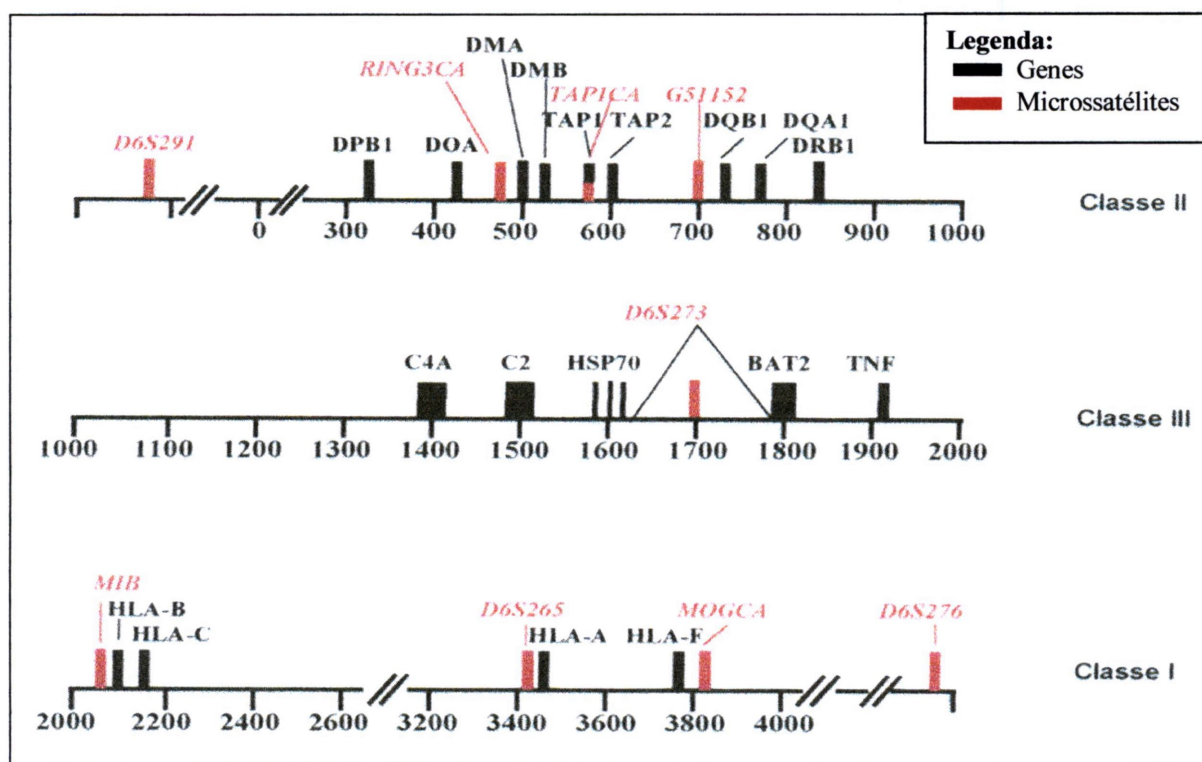


FIGURA 3 - MAPA DO CPH MOSTRANDO ALGUNS GENES DAS REGIÕES DE CLASSES I, II E III E A LOCALIZAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES

### 3.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação de cada amostra foi realizada por meio de uma reação simples e duas reações multiplex, preparando-se para cada grupo de microssatélites a mistura adequada de iniciadores cujas seqüências estão descritas na tabela 5. As reações foram realizadas num volume total de 20 $\mu$ L contendo Tris-HCl 20mM pH 8,4, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, desóxi-ribonucleotídeos 0,2mM, 3 a 9 picomoles de iniciadores, conforme demonstrado na tabela 6, e 0,5 da unidade de Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen 10966-034). Após a adição de 100ng de DNA as reações foram submetidas, em termociclador da Applied Biosystems (PE 9700), às seguintes condições de ciclagem: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos constituídos de desnaturação (94°C por 15 segundos), anelamento (55°C por 15 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos), e para finalizar uma etapa de extensão de 30 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram testados para amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

TABELA 5 -SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TIPIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES LOCALIZADOS NA REGIÃO DO CPH

<b>Loco</b>	<b>Seqüência 5'- 3'</b>	<b>Seqüência 3'- 5'</b>
<i>D6S265</i>	5' agt cac cct act gtc cta tc 3'	5' atc gag gta aac agc aga aag 3'
<i>D6S273</i>	5' gga gaa gtt gag tat ttc tgc 3'	5' acc aaa ctt caa att ttc gg 3'
<i>D6S276</i>	5' tca atc aaa tca tcc cca gaa g 3'	5' cct tct ttg cag act gtc acc 3'
<i>D6S291</i>	5' ggc att cag gca tgc ctg gc 3'	5' ggg gat gac gaa tta ttc act aac t 3'
<i>G51152</i>	5' ggt aaa att cct gac tgg cc 3'	5' gac agc tct tct taa cct gc 3'
<i>MIB</i>	5' gct tca ccc gat cag tag aag ac 3'	5' gca tgg tgt cag aga tag tca ggt c 3'
<i>MOGCA</i>	5' gaa atg tga gaa taa agg aga 3'	5' gat aaa ggg gaa cta cta ca 3'
<i>RING3CA</i>	5' tgc tta tag gga gac tac cg 3'	5' gag gta atg tca cag gat ggg 3'
<i>TAPICA</i>	5' gct ttg atc tcc ccc ctc 3'	5' gga caa tat ttt gct cct gag g 3'

TABELA 6 -QUANTIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES, NO TUBO DE REAÇÃO\*, PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE MICROSSATÉLITES POR MEIO DA PCR

<b>Grupo I</b>	<b>Iniciadores (1 pM/µL)</b>	<b>Grupo II</b>	<b>Iniciadores (10pM/µL)</b>	<b>Grupo III</b>	<b>Iniciadores (10pM/µL)</b>
<i>D6S273.5</i>	0,9µL	<i>D6S265.5</i>	0,5µL	<i>MOGCA.5</i>	0,8µL
<i>D6S273.3</i>	0,9µL	<i>D6S265.3</i>	0,5µL	<i>MOGCA.3</i>	0,8µL
<i>D6S291.5</i>	0,5µL	<i>MIB.5</i>	0,6µL		
<i>D6S291.3</i>	0,5µL	<i>MIB.3</i>	0,6µL		
<i>TAPICA.5</i>	0,3µL	<i>RING3CA.5</i>	0,8µL		
<i>TAPICA.3</i>	0,3µL	<i>RING3CA.3</i>	0,8µL		
<i>D6S276.5</i>	0,9µL				
<i>D6S276.3</i>	0,9µL				
<i>G51152.5</i>	0,6µL				
<i>G51152.3</i>	0,6µL				

\*Volume total: 20 µL

### 3.6.2 Preparo das Amostras para Eletroforese em Gel Desnaturante

Os produtos de PCR foram diluídos e misturados de acordo com as seguintes proporções:

<b>Produtos da PCR</b>	<b>Diluições</b>	<b>Quantidades (µL)</b>
<b>Grupo I</b>	1:5	4
<b>Grupo II</b>	1:10	2
<b>Grupo III</b>	1:5	4
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	10

Foram combinados 2,5µL da mistura de produtos amplificados de cada amostra com 3,5µL de tampão de carregamento/padrão [2,2µL de formamida deionizada + 0,43µL de dextran blue (50mg/mL em EDTA 25mM) + 0,87µL de GS-350 ROX]. Esse padrão GS-350 ROX (Applied Biosystems 401735), empregado como controle interno em cada cavidade do gel, possibilita a determinação precisa do tamanho de fragmentos de DNA na faixa de 50 a 350 bases. A seguir as amostras foram desnaturadas, em termociclador, a 96°C por 2 minutos, e colocadas imediatamente sobre gelo moído. Essas amostras podem permanecer em solução contendo formamida pelo tempo máximo de algumas horas, e devem ser preparadas próximo ao momento de sua aplicação nas cavidades do gel.

### 3.6.3 Eletroforese em Gel Desnaturante

O gel desnaturante foi preparado com 18g de uréia, 27mL de H<sub>2</sub>O bidestilada, 5mL de solução Long Ranger<sup>Tm</sup> 50% (Cambrex Bio Science 50611) e 2,5g de resina AG 501-X8 (Biorad 143-6424). A mistura foi coberta com *parafilm* e levada ao agitador por 30 minutos para haver dissolução completa da uréia. A seguir foi passada através de filtro de nitrato de celulose 0,2µm e deixada sob vácuo por 5 minutos para remoção de gás. Ao filtrado foram adicionados 5mL de TBE 10X, 250µL de persulfato de amônio e 25µL de TEMED.

A solução do gel foi introduzida, com auxílio de uma seringa, no espaço entre as placas de vidro separadas por espaçadores e encaixadas no *cassette* próprio do seqüenciador. O êmbolo da seringa foi empurrado com movimento contínuo até que a solução de gel preenchesse todo o espaço entre as placas e sem a formação de bolhas. O pente foi inserido e firmado com dois grampos equidistantes do centro, e o conjunto deixado em repouso por um período mínimo de duas horas até a completa polimerização do gel.

A seguir, o *cassette* com as placas contendo o gel polimerizado foi acoplado no seqüenciador ABI PRISM<sup>®</sup> 377, e as câmaras (superior e inferior) foram preenchidas com tampão TBE 1X (10,8g de Tris-Base, 5,5g de ácido bórico, 4mL de EDTA 0,5M pH 8,0 e água em quantidade suficiente para um litro). O gel foi submetido à pré-corrída durante cerca de 20 minutos, e logo após 2µL de cada amostra foram aplicados em cada cavidade do gel e deu-se início à corrida eletroforética por duas horas e trinta minutos. Para o manuseio do equipamento, observaram-se as instruções contidas no manual do usuário do seqüenciador ABI PRISM<sup>®</sup> 377.

### 3.6.4 Análise e Interpretação dos Resultados

A coleta de dados e a análise dos fragmentos de DNA foram realizadas com auxílio dos programas ABI PRISM<sup>®</sup> Genescan 2.1 e ABI PRISM<sup>®</sup> Genotyper 2.0. A designação dos alelos foi baseada no tamanho dos fragmentos amplificados, ou seja, no número de pares de bases. A marcação fluorescente dos oligonucleotídeos iniciadores foi escolhida de modo a permitir que os produtos amplificados de vários locos, cujos alelos apresentassem sobreposição de tamanhos, pudessem ser misturados e submetidos à eletroforese na mesma cavidade do gel. A cor fornecida pelos fluoróforos conjugados aos oligonucleotídeos iniciadores 5', usados na amplificação das amostras, e o intervalo de variação do tamanho dos alelos estão descritos na tabela 7.

TABELA 7 - INFORMAÇÕES SOBRE O TAMANHO DOS ALELOS E OS FLUORÓFOROS UTILIZADOS NA MARCAÇÃO DOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES DO CPH

<b>Loco Microssatélite</b>	<b>Faixa de Tamanho dos alelos (pb)</b>	<b>Fluoróforo para marcação dos iniciadores</b>	<b>Cor do Fluoróforo</b>
<i>D6S276</i>	63 - 151	HEX	VERDE
<i>G51152</i>	193 - 251	HEX	VERDE
<i>MOGCA</i>	122 - 160	NED	AMARELO
<i>D6S265</i>	176 - 218	NED	AMARELO
<i>MIB</i>	257 - 295	NED	AMARELO
<i>D6S273</i>	139 - 163	6-FAM	AZUL
<i>TAP1CA</i>	187 - 211	6-FAM	AZUL
<i>RING3CA</i>	221 - 243	6-FAM	AZUL
<i>D6S291</i>	166 - 186	6-FAM	AZUL

**pb:** pares de bases.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências de indivíduos portadores de cada variante alélica, bem como as frequências alélicas e as genóticas dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes das citocinas e dos locos microssatélites, foram obtidas por contagem direta. As estimativas de máxima verossimilhança das frequências haplotípicas foram obtidas utilizando-se um algoritmo de maximização e expectativa (EM) incluído no pacote de programas ARLERQUIN versão 2.000 (SCHNEIDER et al., 2000). As análises foram realizadas utilizando-se as seguintes condições: número de valores iniciais de maximização e expectativa igual a 50; número de condições iniciais para *bootstrap* igual a 10; número máximo de iterações igual a 5000 e número de réplicas de *bootstrap* igual a 500. Realizamos múltiplas análises variando as condições iniciais e constatamos que os resultados não foram sensíveis a estas variações.

A magnitude das associações entre as variantes polimórficas e o PFE foi estimada por meio do cálculo da razão de probabilidade, também denominada *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%, pelo método de WOOLF (1955). O intervalo de confiança foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

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

O valor da OR é uma estimativa do risco relativo, que indica quantas vezes um caráter em estudo é mais frequente entre portadores de um certo fator do que entre aqueles que não possuem o mesmo fator. No presente estudo, o caráter em questão é o pênfigo foliáceo, e os fatores correspondem às variantes alélicas, genóticas e haplotípicas dos genes e dos locos microssatélites investigados. A obtenção do valor da OR requer a construção de uma tabela de contingência 2x2, devendo ser incluídos os números absolutos de pacientes com o fator (célula A), de pacientes sem o fator (célula B), de controles com o fator (célula C) e de controles sem o fator (célula D). O cálculo do valor de OR é efetuado por meio da operação matemática (A.D) / (B.C). Quando o valor de uma das células for zero, emprega-se a correção de Haldane, segundo a fórmula:  $OR = [(A+0,5). (D+0,5)] / [(B+0,5).(C+0,5)]$ . Valores de OR iguais a 1 sugerem que o fator analisado não está associado ao caráter em questão, enquanto valores maiores do que 1 indicam

associação positiva e valores inferiores a 1, associação negativa entre o fator e o caráter.

A determinação da significância estatística das diferenças das frequências fenotípicas, alélicas e haplotípicas, observadas entre o grupo de pacientes e o de indivíduos-controle, foi efetuada pela análise das tabelas de contingência 2x2 para obter o valor de *P*. Este valor foi determinado pelo teste exato de Fisher, implementado pelo algoritmo Metropolis, com auxílio do programa de computação RxC (MILLER, 1997). O valor de *P* igual a 0,05 foi adotado como limiar de significância para todos os testes estatísticos realizados. Optamos pela aplicação da correção de Bonferroni aos valores de *P* inferiores a 0,05 pelo fato de este ser o primeiro estudo de associação do PFE com variantes dos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4*, *IL4R*, *IL6*, *IL10*, bem como com variantes dos locos microssatélites *D6S265*, *D6S273*, *D6S276*, *D6S291*, *G51152*, *MIB*, *MOGCA*, *RING3CA* e *TAPICA*. Esta correção corresponde à multiplicação do valor de *P* pelo número de variáveis independentes analisadas.

A significância estatística das diferenças entre as frequências de variantes dos genes das citocinas observadas neste estudo e as frequências relatadas em outros trabalhos, referidos na discussão desta tese, foi avaliada pelo teste exato de Fisher, implementado pelo algoritmo Metropolis, com auxílio do programa de computação RxC (MILLER, 1997). O valor de *P* igual a 0,05 foi adotado como limiar de significância para esses testes estatísticos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP) NOS GENES DAS INTERLEUCINAS

#### 4.1.1 Análise de Polimorfismos do Complexo Gênico *IL1*

A comparação das frequências dos portadores das variantes alélicas nas posições -889 (C → T) do gene *IL1A*, -511 (C → T) e +3954 (C → T) do gene *IL1B* e do nucleotídeo 9261 (A → G) do gene *IL1RN* não demonstra a presença de associação positiva ou negativa com pênfigo foliáceo endêmico (PFE) (tabela 8). Análises das frequências alélicas e genotípicas para cada uma das posições polimórficas dos referidos genes também não demonstram a existência de associação entre estas e o PFE (tabela 8). Inicialmente, as variantes alélicas dos genes *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN* foram tipificadas e analisadas em uma subamostra constituída de 50 pacientes e de 52 controles caucasóides. Após a verificação dos resultados, não prosseguimos com a tipificação da amostra total pelo fato de não haver sequer uma tendência de associação entre as variantes destes genes investigados e o pênfigo foliáceo endêmico.

As frequências genotípicas da posição *IL1A* -889 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) nos pacientes ( $P = 1,00000$ ) e nos controles ( $P = 1,00000$ ). O equilíbrio de H-W também foi observado nas frequências genotípicas dos pacientes ( $P = 0,07928$ ) e controles ( $P = 0,78421$ ) analisados para a posição *IL1B* -511, dos pacientes ( $P = 1,00000$ ) e controles ( $P = 0,31994$ ) analisados para a posição *IL1B* +3954 e dos pacientes ( $P = 0,75633$ ) e controles ( $P = 0,75953$ ) analisados para o nucleotídeo 9261 de *IL1RN*.

Quando analisamos os haplótipos (tabela 9) considerando as quatro posições (*IL1A* -889 \_ *IL1B* \_ -511 \_ *IL1B* +3954 \_ *IL1RN* +9261), observamos uma frequência superior do haplótipo TTCA no grupo de pacientes (OR = 3,94), sem que a diferença fosse estatisticamente significativa após a correção do valor de  $P$ . Todas as possíveis combinações de três e de duas posições polimórficas também foram analisadas, porém, nenhum dos haplótipos evidenciou associação positiva ou negativa com PFE (resultados não mostrados).

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES CAUCASÓIDES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DE *IL1A* -889, *IL1B* -511, *IL1B* +3954 e *IL1RN* nt 9261

Frequências	Pacientes	Controles			
<b><i>IL1A</i> -889</b>	<b>n = 49</b>	<b>n = 52</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>			
Portadores das Variantes					
-889 C	89,8	92,3	0,73	0,19 - 2,91	0,73659
-889 T	53,1	50,0	1,13	0,52 - 2,47	0,84309
Alélicas					
-889 C	68,4	71,2	0,88	0,48 - 1,60	0,75669
-889 T	31,6	28,8	1,14	0,63 - 2,08	0,74776
Genotípicas <i>IL1A</i> -889					
C/C	46,9	50,0	0,88	0,41 - 1,93	0,84216
C/T	42,9	42,3	1,02	0,46 - 2,25	1,00000
T/T	10,2	7,7	1,36	0,34 - 5,40	0,73616
<b><i>IL1B</i> -511</b>	<b>n = 47</b>	<b>n = 51</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>			
Portadores das Variantes					
-511 C	74,5	84,3	0,54	0,20 - 1,47	0,31419
-511 T	61,7	66,7	0,81	0,35 - 1,84	0,67405
Alélicas					
-511 C	56,4	58,8	0,90	0,51 - 1,60	0,77037
-511 T	43,6	41,2	1,11	0,63 - 1,95	0,77610
Genotípicas <i>IL1B</i> -511					
C/C	38,3	33,3	0,62	0,25 - 1,52	0,67682
C/T	36,2	51,0	0,54	0,24 - 1,22	0,15569
T/T	25,5	15,7	1,84	0,68 - 5,01	0,31826
<b><i>IL1B</i> +3954</b>	<b>n = 49</b>	<b>n = 50</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>			
Portadores das Variantes					
+3954 C	98,0	100,0	0,32	0,01 - 8,05	0,49934
+3954 T	32,7	34,0	0,94	0,41 - 2,17	1,00000
Alélicas					
+3954 C	82,7	83,0	0,98	0,47 - 2,04	1,00000
+3954 T	17,3	17,0	1,02	0,49 - 2,14	1,00000
Genotípicas <i>IL1B</i> +3954					
C/C	67,3	66,0	1,06	0,46 - 2,45	1,00000
C/T	30,6	34,0	0,86	0,37 - 1,99	0,82970
T/T	2,0	0	3,12	0,12 - 78,56	0,49440
<b><i>IL1RN</i> nt 9261</b>	<b>n = 50</b>	<b>n = 48</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>			
Portadores das Variantes					
nt 9261 A	90,0	85,4	1,54	0,45 - 5,22	0,55122
nt 9261 G	58,0	58,3	0,99	0,44 - 2,20	1,00000
Alélicas					
nt 9261 A	66,0	63,5	1,11	0,62 - 2,00	0,76569
nt 9261 G	34,0	36,5	0,90	0,50 - 1,61	0,75838
Genotípicas <i>IL1RN</i> nt 9261					
A/A	42,0	41,7	1,01	0,45 - 2,26	1,00000
A/G	48,0	43,8	1,19	0,54 - 2,63	0,69214
G/G	10,0	14,6	0,65	0,19 - 2,21	0,54886

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

TABELA 9 -COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES CAUCASÓIDES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DO COMPLEXO GÊNICO *ILI* (*IL1A* -889\_ *IL1B* -511\_ *IL1B* +3954\_ *IL1RN* nt 9261)

Haplótipos	Pacientes 2n = 92 %	Controles 2n = 100 %	OR	IC 95%	P	Pc
CCCA	29,2	28,3	1,07	0,57 - 2,00	0,87294	
CCCG	10,4	9,5	1,10	0,43 - 2,77	1,00000	
CTCA	9,3	14,7	0,61	0,25 - 1,48	0,38416	
CTCG	20,6	16,3	1,37	0,66 - 2,85	0,45044	
CTTA	0	1,1	na	na	na	
TCCA	5,4	3,4	1,86	0,43 - 8,00	0,48708	
TCCG	0	2,8	na	na	na	
TCTA	12,5	14,1	0,83	0,36 - 1,94	0,83110	
TCTG	0	1,8	na	na	na	
TTCA	10,9	3,4	3,94	1,05-14,81	<b>0,04146</b>	<b>0,29022</b>
TTCG	0	4,5	na	na	na	
TTTG	1,6	0	na	na	na	

**OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de haplótipos analisados, ou seja, 7); na: não analisado porque a frequência em ambos os grupos foi inferior a 5%

#### 4.1.2 Análise da Posição -590 do Gene *IL4*

Os resultados da análise das variantes da posição -590 do gene *IL4* encontram-se na tabela 10. A frequência dos portadores da variante -590 C é significativamente menor nos pacientes com PFE do que nos controles (OR = 0,37). A análise das subamostras demonstra a mesma tendência da frequência da variante -590 C nos pacientes, contudo, sem significância estatística nos caucasóides (OR = 0,65) e nos negróides (OR = 0,31). Apesar de a frequência da variante -590 T ser superior no grupo de pacientes da subamostra de caucasóides, a diferença não apresenta significância estatística após a correção do valor de *P*.

A investigação das frequências alélicas de *IL4* -590 mostra que a frequência do alelo -590 T é superior, enquanto a do alelo -590 C é inferior tanto nos pacientes da amostra total quanto nos da subamostra de caucasóides. Entretanto, estas diferenças nas frequências alélicas entre pacientes e controles não são estatisticamente significantes após a correção do valor de *P* em nenhum dos grupos amostrais. Esta mesma tendência é observada nos negróides, nos quais o valor de *P* também não tem significância estatística.

As frequências do genótipo C/C do nucleotídeo -590 são mais baixas nos pacientes da amostra total e nos caucasóides, embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas (nos caucasóides, somente após correção do valor de *P*). Nos negróides, a frequência do genótipo C/C observada nos pacientes é superior à dos controles, mas a diferença não tem significância estatística. Quanto ao genótipo T/T, constata-se que está associado positivamente com PFE na amostra total (OR = 2,71). As frequências de T/T são superiores também nos pacientes caucasóides e negróides, contudo as diferenças não são estatisticamente significantes, sendo esta observação feita nos negróides após a correção de Bonferroni. Em relação ao genótipo C/T, as frequências observadas em pacientes e controles não diferem com significância estatística na amostra total e na subamostra caucasóides e tampouco na dos negróides após a correção do valor de *P*.

As frequências genotípicas da posição *IL4* -590 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes ( $P = 0,40517$ ) e controles ( $P = 0,20680$ ) da amostra total quanto nos pacientes ( $P = 0,48027$ ) e controles ( $P = 0,81410$ ) caucasóides e nos pacientes ( $P = 0,07054$ ) e controles ( $P = 0,06469$ ) negróides.

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO POLIMORFISMO -590 (C → T) DO GENE *IL4*

Frequências	Amostra Total						Amostra Caucasóide						Amostra Negróide					
	Pac n= 150 %	Con n=160 %	OR	IC 95%	P	Pc	Pac n=80 %	Con n=119 %	OR	IC 95%	P	Pc	Pac n=62 %	Con n=61 %	OR	IC 95%	P	Pc
<b>Portadores</b>																		
<i>IL4</i> -590 C	80,7	91,9	<b>0,37</b>	<b>0,18 - 0,74</b>	<b>0,00446</b>	<b>0,04014</b>	88,8	92,4	0,65	0,24 - 1,70	0,45420		74,2	90,2	0,31	0,11 - 0,87	<b>0,03136</b>	<b>0,28224</b>
<i>IL4</i> -590 T	64,7	56,9	1,39	0,88 - 2,19	0,16812		62,5	45,4	2,01	1,12 - 3,58	<b>0,02126</b>	<b>0,19134</b>	62,9	70,5	0,71	0,33 - 1,51	0,44798	
<b>Alélicas</b>																		
<i>IL4</i> -590 C	58,0	67,5	0,66	0,48 - 0,92	<b>0,01361</b>	<b>0,12249</b>	63,1	73,5	0,62	0,40 - 0,95	<b>0,03740</b>	<b>0,33660</b>	55,7	59,8	0,84	0,51 - 1,40	0,52830	
<i>IL4</i> -590 T	42,0	32,5	1,50	1,08 - 2,09	<b>0,01330</b>	<b>0,11970</b>	36,9	26,5	1,62	1,05 - 2,50	<b>0,03606</b>	<b>0,32454</b>	44,3	40,2	1,19	0,72 - 1,97	0,52448	
<b>Genotípicas</b>																		
C/C	35,3	43,1	0,72	0,46 - 1,14	0,16455		37,5	54,6	0,50	0,28 - 0,89	<b>0,02048</b>	<b>0,18432</b>	37,1	29,5	1,41	0,66 - 2,99	0,44938	
C/T	45,3	48,8	0,87	0,56 - 1,36	0,56555		51,3	37,8	1,73	0,97 - 3,07	0,07769		37,1	60,7	0,38	0,18 - 0,79	<b>0,01160</b>	<b>0,10440</b>
T/T	19,3	8,1	<b>2,71</b>	<b>1,35 - 5,44</b>	<b>0,00461</b>	<b>0,04149</b>	11,3	7,6	1,55	0,59 - 4,09	0,45059		25,8	9,8	3,19	1,15 - 8,81	<b>0,03168</b>	<b>0,28512</b>

Pac: Pacientes; Con: Controles; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; P: Probabilidade; Pc: Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de P multiplicado pelo número de polimorfismos de citocinas analisados, ou seja, 9)

#### 4.1.3 Análise do Nucleotídeo 148 do Gene *IL4R*

As frequências de portadores das variantes, bem como as frequências alélicas e genotípicas, observadas para o nucleotídeo 148 do gene *IL4R* não evidenciam associação positiva ou negativa ao se fazer comparações entre o grupo de pacientes com PFE e o grupo controle da amostra total (tabela 11). O mesmo foi observado quando as subamostras de caucasóides e de negróides foram analisadas separadamente (tabela 11).

As frequências genotípicas do nucleotídeo 148 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes ( $P = 0,86860$ ) e controles ( $P = 0,63170$ ) da amostra total, nos pacientes ( $P = 0,26264$ ) e controles ( $P = 0,85534$ ) da subamostra caucasóide, bem como nos pacientes ( $P = 0,19990$ ) e nos controles ( $P = 0,60889$ ) da subamostra negróide.

#### 4.1.4 Análise da Posição -174 do Gene *IL6*

O resultado da análise das frequências de portadores das variantes da posição -174 do gene *IL6* (tabela 12), na amostra total, mostra associação positiva do alelo -174 G com PFE (OR = 7,66). Por meio da análise das subamostras também se evidencia uma frequência mais elevada do alelo G nos pacientes quando comparados aos controles, embora a diferença não seja estatisticamente significativa nos negróides (OR = 5,25) e nos caucasóides (OR = 5,63), nestes após correção do valor de  $P$  (tabela 12). Com respeito às frequências do alelo -174 C, não foram observadas diferenças com significância estatística entre os pacientes e controles da amostra total e nem das subamostras caucasóide e negróide (tabela 12).

A comparação das frequências alélicas das variantes de *IL6* -174 entre pacientes e controles não demonstra diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos amostrais (tabela 12). Entretanto, exceto nos negróides, observa-se uma elevação da frequência do alelo G e uma diminuição da frequência do alelo C nos pacientes da amostra total e da subamostra caucasóide.

TABELA 11 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO POLIMORFISMO DO NUCLEOTÍDEO 148 (A → G) DO GENE *IL4R*

Frequências	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide				
	Pac n=150 %	Con n= 160 %	OR	IC 95%	P	Pac n=80 %	Con n=119 %	OR	IC 95%	P	Pac n=62 %	Con n=61 %	OR	IC 95%	P
<b>Portadores</b>															
<i>IL4R</i> nt 148 A	74,0	81,3	0,66	0,38 - 1,13	0,13971	81,3	79,0	1,15	0,56 - 2,35	0,72356	61,3	75,4	0,52	0,24 - 1,12	0,11418
<i>IL4R</i> nt 148 G	77,3	70,6	1,42	0,85 - 2,37	0,18760	76,3	69,7	1,39	0,73 - 2,66	0,33436	79,0	78,7	1,02	0,43 - 2,43	1,00000
<b>Alélicas</b>															
<i>IL4R</i> nt 148 A	48,0	55,0	0,76	0,55 - 1,04	0,09048	52,5	54,6	0,92	0,61 - 1,37	0,68106	41,1	48,4	0,75	0,45 - 1,23	0,30928
<i>IL4R</i> nt 148 G	52,0	45,0	1,32	0,96 - 1,81	0,09153	47,5	45,4	1,09	0,73 - 1,63	0,68728	58,9	51,6	1,34	0,81 - 2,22	0,30802
<b>Genotípicas</b>															
A/A	22,7	29,4	0,70	0,42 - 1,18	0,19772	23,8	30,3	0,72	0,38 - 1,37	0,33389	21,0	21,3	0,98	0,41 - 2,33	1,00000
A/G	51,3	51,9	0,98	0,63 - 1,53	1,00000	57,5	48,7	1,42	0,80 - 2,52	0,24717	40,3	54,1	0,57	0,28 - 1,17	0,15092
G/G	26,0	18,8	1,52	0,89 - 2,61	0,13784	18,8	21,0	0,87	0,42 - 1,77	0,72513	38,7	24,6	1,94	0,89 - 4,20	0,11730

Pac: Pacientes; Con: Controles; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; P: Probabilidade

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO POLIMORFISMO -174 (G → C) DO GENE *IL6*

Frequências	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide						
	Pac n=150 %	Con n=160 %	OR	IC 95%	P	Pc	Pac n= 80 %	Con n=119 %	OR	IC 95%	P	Pc	Pac n=62 %	Con n= 61 %	OR	IC 95%	P
<b>Portadores</b>																	
<i>IL6</i> -174 G	98,7	90,6	7,66	1,72 - 34,07	0,00190	0,01710	97,5	87,4	5,63	1,25 - 25,32	0,01836	0,16524	100,0	96,7	5,25	0,25-111,69	0,24442
<i>IL6</i> -174 C	41,3	41,9	0,98	0,62 - 1,54	1,00000		42,5	50,4	0,73	0,41 - 1,29	0,31762		41,9	32,8	1,48	0,71 - 3,09	0,35800
<b>Alélicas</b>																	
<i>IL6</i> -174 G	79,0	74,0	1,27	0,87 - 1,85	0,22539		77,5	68,5	1,58	1,00 - 2,51	0,05357		79,0	82,0	0,83	0,44 - 1,56	0,63186
<i>IL6</i> -174 C	21,0	26,0	0,79	0,54 - 1,14	0,22480		22,5	31,5	0,63	0,40 - 1,00	0,05400		21,0	18,0	1,21	0,64 - 2,27	0,62902
<b>Genotípicas</b>																	
G/G	58,7	58,1	1,02	0,65 - 1,61	1,00000		57,5	49,6	1,38	0,78 - 2,43	0,30880		58,1	67,2	0,68	0,32 - 1,41	0,34800
G/C	40,0	32,5	1,38	0,87 - 2,20	0,18625		40,0	37,8	1,10	0,61 - 1,96	0,76571		41,9	29,5	1,73	0,82 - 3,64	0,19802
C/C	1,3	9,4	0,13	0,03 - 0,58	0,00202	0,01818	2,5	12,6	0,18	0,04 - 0,80	0,01804	0,16236	0	3,3	0,19	0,01 - 4,05	0,24172

**Pac:** Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de P multiplicado pelo número de polimorfismos de citocinas analisados, ou seja, 9)

Em relação às frequências genóticas de *IL6* -174 (tabela 12), a comparação entre pacientes e controles mostra uma associação negativa de C/C com PFE. A diferença das frequências do genótipo C/C apresenta significância estatística apenas na amostra total (OR = 0,13). Apesar da aparente diminuição da frequência de C/C nos pacientes, quando se analisam separadamente os negróides (OR = 0,19) e os caucasóides (OR = 0,18), as diferenças não são estatisticamente significativas nos negróides, e tampouco nos caucasóides, após a correção do valor de *P* nestes últimos. As frequências dos genótipos G/G e G/C não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes e os controles. As frequências genóticas da posição *IL6* -174 da amostra total encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos controles ( $P = 0,06802$ ), porém não nos pacientes ( $P = 0,02431$ ). Já o teste de Hardy-Weinberg, realizado nas subamostras, demonstra que as frequências genóticas de *IL6* -174 estão em equilíbrio tanto nos pacientes ( $P = 0,33177$ ) e controles ( $P = 0,19356$ ) caucasóides quanto nos pacientes ( $P = 0,05235$ ) e controles ( $P = 1,00000$ ) negróides. A análise de *IL6* -174 foi baseada nos resultados da genotipificação obtidos por PCR-RFLP e confirmados por PCR-SSO, havendo concordância de 99,44% entre os dois métodos.

#### 4.1.5 Análise das Posições -592 e -1082 do Gene *IL10*

A comparação de frequências de portadores das variantes alélicas da posição -592, tanto A como o C, do gene *IL10* não demonstra diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles em nenhum dos grupos amostrais (tabela 13). O mesmo foi observado em relação às variantes A e G da posição -1082 do mesmo gene, tanto para a amostra total quanto para a subamostra caucasóide (tabela 13). Nos negróides, embora a frequência da variante G seja inferior nos pacientes quando comparada aos controles (OR = 0,47), a diferença apresentou significância estatística limítrofe e não foi observada após correção do valor de *P* (tabela 13).

Com respeito às frequências alélicas de -592 C e -592 A, não há diferença significativa entre os pacientes e controles para nenhum dos grupos amostrais (tabela 13). Para a posição -1082, também não ocorre diferença significativa entre as frequências dos alelos A e G na amostra total nem nos caucasóides (tabela 13). Na amostra de negróides observam-se uma elevação da frequência de -1082 A (OR = 2,03) e uma diminuição da frequência de -1082 G (OR = 0,49) nos pacientes; contudo, as diferenças não apresentam significância estatística após correção dos valores de *P* (tabela 13).

TABELA 13 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DOS POLIMORFISMOS -592 (C → A) E -1082 (A → G) DO GENE *IL10*

Frequências	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide					
	Pac n=150 %	Con n=160 %	OR	IC 95%	P	Pac n=80 %	Con n=120 %	OR	IC 95%	P	Pac n=62 %	Con n=61 %	OR	IC 95%	P	Pc
<b>Portadores</b>																
-592 C	84,7	86,3	0,88	0,47 - 1,66	0,74487	83,8	86,7	0,79	0,36 - 1,75	0,68412	87,1	83,6	1,32	0,48 - 3,62	0,61440	
-592 A	61,3	60,6	1,03	0,65 - 1,63	0,90632	55,0	59,2	0,84	0,48 - 1,49	0,56712	67,7	63,9	1,18	0,56 - 2,50	0,70974	
-1082 A	90,7	88,1	1,31	0,63 - 2,71	0,57512	87,5	89,1	0,86	0,36 - 2,07	0,82192	95,2	85,2	3,40	0,87 - 13,25	0,07560	
-1082 G	48,7	55,6	0,76	0,48 - 1,18	0,25685	55,0	57,1	0,92	0,52 - 1,62	0,77450	38,7	57,4	0,47	0,23 - 0,96	<b>0,04555</b>	<b>0,40995</b>
<b>Alélicas</b>																
-592 C	62,0	63,0	0,95	0,69 - 1,32	0,81410	64,4	63,8	1,03	0,68 - 1,56	0,91434	59,7	59,8	0,99	0,60 - 1,65	1,00000	
-592 A	38,0	37,0	1,05	0,76 - 1,45	0,80672	35,6	36,2	0,97	0,64 - 1,48	0,91636	40,3	40,2	1,01	0,60 - 1,68	1,00000	
-1082 A	71,0	66,0	1,25	0,89 - 1,75	0,22714	66,3	66,0	1,01	0,66 - 1,55	1,00000	78,2	63,9	2,03	1,15 - 3,56	<b>0,01588</b>	<b>0,14292</b>
-1082 G	29,0	34,0	0,80	0,57 - 1,13	0,22080	33,7	34,0	0,99	0,65 - 1,51	1,00000	21,8	36,0	0,49	0,28 - 0,87	<b>0,01468</b>	<b>0,13212</b>
<b>Genotípicas</b>																
<i>IL10</i> -592																
C/C	38,7	39,4	0,97	0,61 - 1,53	0,90719	45,0	40,8	1,19	0,67 - 2,10	0,55900	32,3	36,1	0,84	0,40 - 1,78	0,70468	
C/A	46,0	46,9	0,97	0,62 - 1,51	0,90826	38,8	45,8	0,75	0,42 - 1,33	0,37817	54,8	47,5	1,34	0,66 - 2,72	0,46132	
A/A	15,3	13,8	1,14	0,60 - 2,14	0,74785	16,3	13,3	1,26	0,57 - 2,79	0,68353	12,9	16,4	0,76	0,28 - 2,06	0,61104	
<b>Genotípicas</b>																
<i>IL10</i> -1082																
A/A	51,3	44,4	1,32	0,85 - 2,07	0,25543	45,0	42,9	1,09	0,62 - 1,93	0,77218	61,3	42,6	2,13	1,04 - 4,38	<b>0,04712</b>	<b>0,42408</b>
A/G	39,3	43,8	0,83	0,53 - 1,31	0,49456	42,5	46,2	0,86	0,49 - 1,52	0,66786	33,9	42,6	0,69	0,33 - 1,43	0,35456	
G/G	9,3	11,9	0,76	0,37 - 1,58	0,58000	12,5	10,9	1,16	0,48 - 2,80	0,82217	4,8	14,8	0,29	0,08 - 1,14	0,07878	

Pac: Pacientes; Con: Controles; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; P: Probabilidade; Pc: Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de P multiplicado pelo número de polimorfismos de citocinas analisados, ou seja, 9)

Quando se analisam as frequências genotípicas das posições -592 e -1082 constata-se não haver diferença significativa entre pacientes e controles na amostra total e tampouco nas subamostras (tabela 13). Exceto no genótipo A/A da posição -1082, que apresentou uma frequência superior nos pacientes negróides do que nos controles (OR = 2,13), entretanto, a diferença é de significância estatística limítrofe e não foi observada após a correção do valor de  $P$  (tabela 13).

As frequências genotípicas da posição -1082 estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes ( $P = 0,55978$ ) e controles ( $P = 0,85893$ ) da amostra total, nos pacientes ( $P = 0,62947$ ) e controles ( $P = 0,83831$ ) caucasóides, bem como nos pacientes ( $P = 1,00000$ ) e controles ( $P = 0,58494$ ) negróides. Quanto à posição -592, as frequências genotípicas também se mostraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes ( $P = 0,72844$ ) e controles ( $P = 1,00000$ ) da amostra total, nos pacientes ( $P = 0,21847$ ) e controles ( $P = 1,00000$ ) caucasóides, e também nos pacientes ( $P = 0,42717$ ) e controles ( $P = 1,00000$ ) negróides.

A análise das frequências dos haplótipos das variantes polimórficas de *IL10* -1082 e de *IL10* -592 também não demonstra associação de nenhuma das combinações haplotípicas com PFE, seja na amostra total, seja na de caucasóides (tabela 14). Na subamostra negróide, apesar de observar-se uma frequência mais elevada do haplótipo AC (OR = 1,96) no grupo de pacientes, a diferença não apresenta significância estatística após correção do valor de  $P$  (tabela 14). Quanto ao haplótipo GC, a sua frequência é menor nos pacientes do que nos controles (tabela 14), mostrando uma associação negativa fraca com o PFE (OR = 0,49).

TABELA 14 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DO GENE *IL10*

<b>Amostra Total <i>IL10</i> -1082 _ <i>IL10</i> -592</b>	<b>Pacientes 2n = 300 %</b>	<b>Controles 2n = 320 %</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	
A A	38,3	37,2	1,05	0,76 - 1,45	0,81116	
A C	32,7	29,1	1,18	0,84 - 1,67	0,34746	
G C	29,0	33,7	0,80	0,57 - 1,13	0,25102	

<b>Amostra Caucasóide <i>IL10</i> -1082 _ <i>IL10</i> -592</b>	<b>Pacientes 2n = 160 %</b>	<b>Controles 2n = 238 %</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	
A A	35,6	36,6	0,96	0,63 - 1,46	0,91556	
A C	30,6	29,4	1,06	0,68 - 1,64	0,83082	
G C	33,8	34,0	0,99	0,65 - 1,51	1,00000	

<b>Amostra Negróide <i>IL10</i> -1082 _ <i>IL10</i> -592</b>	<b>Pacientes 2n = 124 %</b>	<b>Controles 2n = 122 %</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>P<sub>c</sub></b>
A A	40,3	40,2	1,01	0,60 - 1,68	1,00000	
A C	37,9	23,8	1,96	1,13 - 3,40	<b>0,01860</b>	<b>0,05580</b>
G C	21,8	36,0	<b>0,49</b>	<b>0,28 - 0,87</b>	<b>0,01452</b>	<b>0,04356</b>

**OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **P<sub>c</sub>:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de P multiplicado pelo número de haplótipos analisados, ou seja, 3)

## 4.2 INVESTIGAÇÃO DE NOVOS POLIMORFISMOS NA REGIÃO REGULADORA DO GENE *TNF* POR MEIO DE SEQÜENCIAMENTO DO DNA

O seqüenciamento de um segmento de DNA a montante da região codificadora do gene *TNF*, de trinta e oito células de referência dos WIH, corroborou cinco posições polimórficas cujas substituições de nucleotídeos haviam sido identificadas por meio de estudos anteriores (tabela 15): -1031 (T → C), -863 (C → A), -857 (C → T), -376 (G → A), -308 (G → A) e -238 (G → A), citados no item 1.6.4 desta tese.

Os resultados do seqüenciamento do DNA destas células também levaram à identificação de novas posições que apresentam variabilidade (tabela 15). O DNA isolado da célula número 9092, denominada BM92, apresenta uma substituição de timina por adenina na posição -1491 (T → A). Outras substituições, como a de citosina por timina na célula 9042 (TISI) e de timina por citosina na célula 9047 (PLH), são encontradas nas posições -1391 (C → T) e -1226 (T → C), respectivamente. Na célula 9044 (BRIP) encontramos outra posição variável, na qual ocorre a substituição de guanina por citosina em -1380 (G → C). Esta célula mostra heterozigose G/C nesta posição -1380. As demais células analisadas são homozigotas para todas as novas variantes identificadas por meio do seqüenciamento de suas moléculas de DNA.

Inicialmente pretendia-se identificar novos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), na região reguladora do gene *TNF*, com o objetivo de investigar possíveis associações de suas variantes alélicas com o pênfigo foliáceo endêmico. Devido à prevalência muito baixa das variantes menos freqüentes (tabela 15), não prosseguimos com o desenvolvimento de um método para identificar as novas variantes polimórficas na amostra de pacientes com PFE e controles porque o tamanho da amostra não permitiria a obtenção de resultados estatisticamente confiáveis.

Não prosseguimos com a análise dos SNP reconhecidos previamente a este estudo porque três deles (-863, -308 e -238) já haviam sido investigados nesta mesma amostra, conforme citado no item 1.4 da introdução.

TABELA 15 - SUBSTITUIÇÕES DE PONTO IDENTIFICADAS NA REGIÃO REGULADORA DO GENE *TNF* POR MEIO DE SEQÜENCIAMENTO DO DNA DE CÉLULAS DE REFERÊNCIA DOS WORKSHOPS INTERNACIONAIS DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Número da Célula*	<i>TNF</i> -1491	<i>TNF</i> -1391	<i>TNF</i> -1380	<i>TNF</i> -1226	<i>TNF</i> -1031	<i>TNF</i> -863	<i>TNF</i> -857	<i>TNF</i> -376	<i>TNF</i> -308	<i>TNF</i> -238
9004	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9005	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9010	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9015	T	C	G	T	T	C	T	G	G	G
9016	T	C	G	T	T	C	T	G	G	G
9022	T	C	G	T	T	C	C	G	A	G
9023	T	C	G	T	T	C	C	G	A	G
9030	T	C	G	T	C	A	C	G	G	G
9031	T	C	G	T	C	A	C	G	G	G
9032	T	C	G	T	C	A	C	G	G	G
9033	T	C	G	T	T	C	T	G	G	G
9035	T	C	G	T	T	C	T	G	G	G
9036	T	C	G	T	C	A	C	G	G	G
9038	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9039	T	C	G	T	C	C	C	A	G	A
9040	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9042	T	T**	G	T	T	C	C	G	G	G
9043	T	C	G	T	C	C	C	A	G	A
9044	T	C	CG**	T	T	C	C	G	G	G
9047	T	C	G	C**	T	C	T	G	G	G
9048	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9049	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9050	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9051	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9052	T	C	G	T	C	C	C	G	G	A
9060	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9061	T	C	G	T	T	C	T	G	G	G
9062	T	C	G	T	T	C	T	G	G	G
9063	T	C	G	T	T	C	T	G	A	G
9064	T	C	G	T	C	A	C	G	G	G
9065	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9068	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9069	T	C	G	T	C	A	C	G	G	G
9072	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9084	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9092	A**	C	G	T	T	C	T	G	G	G
9096	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G
9098	T	C	G	T	T	C	C	G	G	G

\* Numeração das células de referência conferida pelos Workshops Internacionais de Histocompatibilidade

\*\* Novas posições que apresentam substituições de ponto identificadas neste estudo: -1491 (T→A), -1391 (C→T), -1380 (G→C) e -1226 (T→C)

### 4.3 ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES DO CPH

O resultado da análise das frequências dos portadores de variantes alélicas de oito dos nove microssatélites analisados (*D6S265*, *D6S273*, *D6S276*, *D6S291*, *MIB*, *MOGCA*, *RING3CA* e *TAPICA*) mostra que nenhuma associação estatisticamente significativa com o PFE é observada, após a correção dos valores de *P* (tabelas 16 a 19 e 21 a 24).

Diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles são encontradas para alelos do loco *G51152* (tabela 20). Os resultados da análise da amostra total evidenciam associações negativas com PFE para os alelos *G51152\*215* (OR = 0,34), *G51152\*217* (OR = 0,27) e *G51152\*223* (OR = 0,39), as quais têm significância estatística após as correções dos valores de *P*. A análise das subamostras demonstra que a associação negativa com o alelo *\*215* é mantida nos caucasóides (OR = 0,33), mas não é observada nos negróides (OR = 0,44) após a correção do valor de *P*. A frequência do alelo *\*217* se mantém inferior nos pacientes em comparação aos controles em ambas subamostras; porém, a diferença não é estatisticamente significativa nos caucasóides, o mesmo sendo observado nos negróides após a correção do valor de *P*. A frequência do alelo *\*223* nos pacientes de ambas subamostras permanece inferior à dos controles, embora a diferença não apresente significância estatística nos negróides e tampouco nos caucasóides, nestes últimos após a correção do valor de *P*.

Por outro lado, a frequência do alelo *G51152\*227* é maior nos pacientes do que nos controles tanto na amostra total (OR = 6,00) quanto nas subamostras caucasóide (OR = 5,73) e negróide (OR = 4,60). As diferenças das frequências são estatisticamente significantes em todos os grupos amostrais, mesmo após a correção dos valores de *P*, evidenciando que a variante *\*227* está associada positivamente ao PFE.

TABELA 16 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *D6S265*

Alelos do Loco <i>D6S265</i>	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide						
	Pac n=137 %	Con n=149 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	<i>Pc</i>	Pac n=72 %	Con n=111 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac n=57 %	Con n=56 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	<i>Pc</i>
*176	26,3	22,1	1,25	0,73-2,16	0,49274		29,2	26,1	1,16	0,60-2,26	0,74152	24,6	19,6	1,33	0,55-3,25	0,64984	
*178	4,4	3,4	1,32	0,39-4,42	0,76358		2,8	3,6	0,76	0,14-4,29	1,00000	7,0	3,6	2,04	0,36-11,60	0,67750	
*180	40,1	52,3	0,61	0,38-0,98	<b>0,03792</b>	<b>0,49296</b>	40,3	50,5	0,66	0,36-1,21	0,23006	42,1	53,6	0,63	0,30-1,33	0,26078	
*182	23,4	25,5	0,89	0,52-1,53	0,68256		30,6	28,8	1,09	0,57-2,08	0,87294	14,0	21,4	0,60	0,22-1,60	0,32720	
*184	37,2	29,5	1,42	0,86-2,32	0,20186		37,5	27,9	1,55	0,82-2,91	0,18670	36,8	28,6	1,46	0,66-3,22	0,43304	
*186	27,0	26,8	1,01	0,60-1,70	1,00000		31,9	27,9	1,21	0,63-2,31	0,62012	19,3	26,8	0,65	0,27-1,58	0,37848	
*188	2,9	5,4	0,53	0,16-1,80	0,39204		2,8	5,4	0,50	0,10-2,55	0,47806	3,5	5,4	0,64	0,10-4,00	0,67854	
*190	1,5	0	5,52	0,26-115,94	0,23240		1,4	0	4,68	0,19-116,44	0,39536	0	0	-	-	-	
*192	6,6	8,7	0,74	0,30-1,78	0,50914		1,4	4,5	0,30	0,03-2,61	0,40656	14,0	14,3	0,98	0,34-2,82	1,00000	
*194	5,1	4,7	1,09	0,37-3,20	1,00000		2,8	2,7	1,03	0,17-6,31	1,00000	8,8	8,9	0,98	0,27-3,59	1,00000	
*196	2,2	0,7	3,31	0,34-32,24	0,35450		1,4	0	4,68	0,19-116,44	0,39342	3,5	1,8	2,00	01,8-22,70	1,00000	
*198	10,2	2,7	4,13	1,32-12,86	<b>0,01332</b>	<b>0,17316</b>	8,3	3,6	2,43	0,66-8,94	0,19534	12,3	0	16,78	0,93-301,31	<b>0,01376</b>	<b>0,17888</b>
*200	0,7	0	3,29	0,13-81,34	0,47804		0	0	-	-	-	1,8	0	3,00	0,12-75,22	1,00000	

Pac: Pacientes; Con: Controles; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; *P*: Probabilidade; *Pc*: Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 13)

TABELA 17 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *D6S273*

Alelos do Loco <i>D6S273</i>	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide					
	Pac n =141 %	Con n= 157 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	<i>Pc</i>	Pac n=73 %	Con n =116 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac n =60 %	Con n =60 %	OR	IC 95%	<i>P</i>
*139	0,7	0	3,36	0,14-83,23	0,47314		1,4	0	4,82	0,19-11,94	0,38356	0	0	-	-	-
*147	24,1	27,4	0,84	0,50-1,42	0,59782		19,2	19,0	1,01	0,48-2,14	1,00000	28,3	36,7	0,68	0,32-1,47	0,44702
*149	8,5	17,8	0,43	0,21-0,88	<b>0,02580</b>	<b>0,20640</b>	5,5	9,5	0,55	0,17-1,81	0,41778	11,7	26,7	0,36	0,14-0,96	0,06432
*151	53,2	46,5	1,31	0,83-2,06	0,29514		57,5	45,7	1,61	0,89-2,91	0,12104	53,3	50,0	1,14	0,56-2,34	0,85154
*153	41,1	36,9	1,19	0,75-1,90	0,48196		41,1	42,2	0,95	0,53-1,73	1,00000	36,7	28,3	1,46	0,68-3,16	0,44036
*155	39,0	43,9	0,82	0,51-1,30	0,42198		45,2	50,0	0,83	0,46-1,48	0,55372	36,7	38,3	0,93	0,44-1,95	1,00000
*157	5,0	6,4	0,77	0,28-2,07	0,62986		2,7	8,6	0,30	0,06-1,40	0,12876	8,3	5,0	1,73	0,39-7,58	0,71580
*159	2,8	5,1	0,54	0,16-1,85	0,37920		1,4	7,8	0,17	0,02-1,33	0,09502	3,3	3,3	1,00	0,14-7,34	1,00000

**Pac:** Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 8)

TABELA 18 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *D6S276*

Alelos do Loco <i>D6S276</i>	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide					<i>Pc</i>
	Pac n =138 %	Con n =138 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac n =72 %	Con n=101 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac n =58 %	Con n=51 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	
*63	2,2	0	7,15	0,37-139,84	0,24670	0	0	-	-	-	5,2	0	6,50	0,33-128,83	0,24512	
*119	16,7	16,7	1,0	0,53-1,88	1,00000	16,7	16,8	0,99	0,44-2,22	1,00000	15,5	19,6	0,75	0,28-2,03	0,62054	
*123	0	0,7	0,33	0,01-8,19	1,00000	0	0	-	-	-	0	2,0	0,29	0,01-7,22	0,46794	
*127	10,9	16,7	0,61	0,30-1,23	0,22260	15,3	15,8	0,96	0,42-2,21	1,00000	5,2	11,8	0,41	0,10-1,73	0,29954	
*129	11,6	13,8	0,82	0,40-1,67	0,72490	9,7	8,9	1,10	0,39-3,11	1,00000	13,8	19,6	0,66	0,24-1,81	0,44882	
*131	19,6	15,2	1,36	0,72-2,54	0,42976	20,8	17,8	1,21	0,57-2,60	0,69298	19,0	15,7	1,26	0,46-3,42	0,80218	
*133	5,8	7,2	0,79	0,30-2,06	0,81348	8,3	2,0	4,50	0,88-22,98	0,06560	3,4	17,6	0,17	0,03-0,81	<b>0,02174</b>	<b>0,30436</b>
*135	11,6	16,7	0,66	0,33-1,30	0,29432	8,3	17,8	0,42	0,16-1,12	0,10690	17,2	11,8	1,56	0,52-4,65	0,58814	
*137	15,2	18,8	0,77	0,41-1,45	0,51940	12,5	12,9	0,97	0,39-2,40	1,00000	20,7	25,5	0,76	0,31-1,87	0,65222	
*139	15,2	8,7	1,88	0,89-4,00	0,13934	13,9	8,9	1,65	0,63-4,29	0,32748	13,8	5,9	2,56	0,64-10,22	0,21592	
*141	10,9	15,9	0,64	0,32-1,30	0,28484	13,9	15,8	0,86	0,36-2,02	0,82896	6,9	13,7	0,47	0,13-1,69	0,34066	
*143	48,6	47,1	1,06	0,66-1,70	0,90760	48,6	51,5	0,89	0,49-1,63	0,76524	46,6	41,2	1,24	0,58-2,66	0,69574	
*145	7,2	8,0	0,90	0,37-2,20	1,00000	8,3	11,9	0,67	0,24-1,89	0,61506	3,4	2,0	1,79	0,16-20,30	1,00000	
*147	2,2	1,4	1,51	0,25-9,19	1,00000	0	0	-	-	-	5,2	3,9	1,34	0,21-8,33	1,00000	

**Pac:** Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 14)

TABELA 19 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *D6S291*

Alelosdo Loco <i>D6S291</i>	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide						
	Pac n=139 %	Con n=147 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	<i>Pc</i>	Pac n=71 %	Con n=110 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	<i>Pc</i>	Pac n=60 %	Con n=55 %	OR	IC 95%	<i>P</i>
*166	5,8	2,2	2,93	0,76-11,28	0,13246		1,4	0	4,70	0,19-117,05	0,39230		11,7	5,5	2,29	0,56-9,34	0,32876
*168	39,6	36,7	1,13	0,70-1,82	0,63562		38,0	43,6	0,79	0,43-1,46	0,53140		43,3	34,5	1,45	0,68-3,08	0,33896
*170	67,6	58,3	1,70	1,05-2,75	<b>0,03836</b>	<b>0,42196</b>	69,0	53,6	1,93	1,03-3,61	<b>0,04364</b>	<b>0,48004</b>	61,7	52,7	1,44	0,69-3,03	0,35190
*172	11,5	16,3	0,67	0,34-1,32	0,29888		12,7	15,5	0,79	0,33-1,89	0,66776		11,7	20,0	0,53	0,19-1,48	0,30734
*174	12,9	13,6	0,94	0,48-1,87	1,00000		12,7	12,7	1,00	0,41-2,44	1,00000		15,0	12,7	1,21	0,42-3,50	0,79492
*176	11,5	17,7	0,61	0,31-1,18	0,18392		12,7	12,7	1,00	0,41-2,44	1,00000		11,7	23,6	0,42	0,16-1,16	0,14142
*178	23,7	23,1	1,03	0,60-1,79	1,00000		26,8	28,2	0,93	0,48-1,82	0,86450		23,3	16,4	1,56	0,61-3,95	0,49656
*180	1,4	1,4	1,06	0,15-7,62	1,00000		2,8	1,4	3,16	0,28-35,51	0,56184		0	0	-	-	-
*182	7,2	4,8	1,55	0,57-4,19	0,45322		4,2	2,7	1,57	0,31-8,02	0,68380		11,7	7,3	1,68	0,46-6,10	0,53054
*184	1,4	0	5,36	0,26-112,72	0,23420		1,4	0,9	1,6	0,10-25,30	1,00000		1,7	0	2,80	0,11-70,14	1,00000
*186	0	1,4	0,21	0,01-4,38	0,49626		0	0,9	0,51	0,02-12,74	1,00000		0	1,8	0,30	0,01-7,53	0,47650

**Pac:** Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 11)

TABELA 20 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *G51152*

Alelos do Loco <i>G51152</i>	Amostra Total						Amostra Caucasóide						Amostra Negróide					
	Pac n=138 %	Con n=149 %	OR	IC 95%	P	Pc	Pac n=72 %	Con n=113 %	OR	IC 95%	P	Pc	Pac n=58 %	Con n=55 %	OR	IC 95%	P	Pc
*193	2,2	1,3	1,63	0,27-9,92	0,67498		1,4	0,9	1,58	0,10-25,63	1,00000		3,4	1,8	0,93	0,17-21,89	1,00000	
*195	1,4	1,3	1,08	0,15-7,78	1,00000		2,8	1,8	1,59	0,22-11,52	0,64312		0	1,8	0,31	0,01-7,79	0,48610	
*207	0	2,7	0,12	0,01-2,19	0,12462		0	2,7	0,22	0,01-4,28	0,28170		0	1,8	0,31	0,01-7,79	0,48610	
*211	0	1,3	0,21	0,01-4,48	0,50030		0	0	-	-	-		0	1,8	0,31	0,01-7,79	0,48610	
*215	37,7	63,8	<b>0,34</b>	<b>0,21-0,56</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>	34,7	61,9	<b>0,33</b>	<b>0,18-0,61</b>	<b>0,00010</b>	<b>0,00110</b>	41,4	61,8	0,44	0,21-0,93	<b>0,03218</b>	<b>0,35398</b>
*217	5,1	16,8	<b>0,27</b>	<b>0,11-0,63</b>	<b>0,00202</b>	<b>0,02222</b>	5,6	15,0	0,33	0,11-1,03	0,05728		3,4	20,0	0,14	0,03-0,68	<b>0,00728</b>	<b>0,08008</b>
*219	2,9	3,4	0,86	0,23-3,27	1,00000		4,2	5,3	0,78	0,19-3,20	1,00000		1,7	1,8	0,95	0,06-15,53	1,00000	
*221	4,3	4,0	1,08	0,34-3,44	1,00000		8,3	5,3	1,62	0,50-5,24	0,54274		0	1,8	0,31	0,01-7,79	0,48610	
*223	15,2	31,5	<b>0,39</b>	<b>0,22-0,69</b>	<b>0,00146</b>	<b>0,01606</b>	15,3	30,0	0,42	0,20-0,89	<b>0,02404</b>	<b>0,26444</b>	17,2	34,5	0,39	0,16-0,95	0,05056	
*227	76,8	35,6	<b>6,00</b>	<b>3,57-0,08</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>	73,6	32,7	<b>5,73</b>	<b>2,98-11,03</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>	79,3	45,5	<b>4,60</b>	<b>2,01-10,53</b>	<b>0,00060</b>	<b>0,00660</b>
*245	23,2	14,8	1,74	0,96-3,18	0,08014		25,0	16,8	1,65	0,80-3,41	0,18488		22,4	9,1	2,89	0,95-8,74	0,07182	

**Pac:** Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 11)

TABELA 21 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *MIB*

Alelos do Loco MIB	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negroíde						
	Pac n=112 %	Con n=143 %	OR	IC 95%	P	Pc	Pac n=60 %	Con n=98 %	OR	IC 95%	P	Pac n=44 %	Con n=53 %	OR	IC 95%	P	Pc
*257	25,5	28,7	0,83	0,47-1,45	0,58860		18,3	21,4	0,82	0,37-1,86	0,68698	34,1	32,1	1,10	0,47-2,56	1,00000	
*263	39,3	25,2	1,92	1,13-3,28	<b>0,02096</b>	<b>0,31440</b>	40,0	30,6	1,51	0,77-2,96	0,22920	40,9	20,8	2,64	1,08-6,47	<b>0,04162</b>	<b>0,62430</b>
*265	0	1,4	0,25	0,01-5,29	0,50632		0	1,0	0,54	0,02-13,40	1,00000	0	1,9	0,39	0,02-9,90	1,00000	
*267	17,0	30,8	0,46	0,25-0,84	<b>0,01074</b>	<b>0,16110</b>	16,7	30,6	0,45	0,20-1,01	0,06530	18,2	34,0	0,43	0,17-1,12	0,10526	
*269	6,3	9,1	0,67	0,26-1,73	0,48464		5,0	7,1	0,68	0,17-2,75	0,74176	9,1	11,3	0,78	0,21-2,97	1,00000	
*271	3,6	1,4	2,61	0,47-14,52	0,40916		1,7	2,0	0,81	0,07-9,17	1,00000	6,8	0	9,02	0,45-179,60	0,09232	
*273	13,4	11,9	1,15	0,55-2,41	0,84900		11,7	9,2	1,31	0,46-3,71	0,60112	11,4	15,1	0,72	0,22-2,39	0,76628	
*275	5,4	4,2	1,29	0,41-4,12	0,76400		6,7	6,1	1,10	0,30-4,05	1,00000	4,5	1,9	2,48	0,22-28,26	0,59040	
*277	16,1	11,9	1,42	0,69-2,90	0,36232		16,7	11,2	1,58	0,63-3,99	0,33572	11,4	13,2	0,84	0,25-2,87	1,00000	
*279	19,6	25,2	0,73	0,40-1,32	0,36446		18,3	22,4	0,78	0,35-1,74	0,68458	25,0	28,3	0,84	0,34-2,09	0,82224	
*281	16,1	13,3	1,25	0,62-2,51	0,59466		16,7	18,4	0,89	0,38-2,08	0,83548	15,9	9,4	1,82	0,53-6,18	0,37412	
*283	15,2	10,5	1,53	0,73-3,21	0,34910		18,3	10,2	1,98	0,78-4,98	0,15154	9,1	11,3	0,78	0,21-2,97	1,00000	
*285	1,8	4,2	0,42	0,08-2,10	0,47688		3,3	8,2	0,39	0,08-1,89	0,32400	0	0	-	-	-	
*287	5,4	7,0	0,75	0,27-2,14	0,79094		8,3	6,1	1,39	0,41-4,78	0,75046	0	7,5	0,12	0,01-2,36	0,12432	
*289	1,8	0	6,49	0,31-136,63	0,19358		3,3	0	8,42	0,40-178,41	0,14386	0	0	-	-	-	

**Pac:** Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 15)

TABELA 22 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *MOGCA*

Alelos do Loco <i>MOGCA</i>	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide				
	Pac n=135 %	Con n=147 %	OR	IC 95%	P	Pac n=68 %	Con n=101 %	OR	IC 95%	P	Pac n=59 %	Con n=55 %	OR	IC 95%	P
*122	35,6	38,8	0,87	0,54-1,41	0,61754	35,3	37,6	0,90	0,48-1,71	0,87388	35,6	40,0	0,83	0,39-1,77	0,70460
*126	0	1,4	0,21	0,01-4,51	0,49976	0	2,0	0,29	0,01-6,15	0,51646	0	0	-	-	-
*130	27,4	28,6	0,94	0,56-1,59	0,89156	33,8	31,7	1,10	0,57-2,12	0,86778	23,7	27,3	0,83	0,36-1,93	0,67450
*132	37,0	33,3	1,18	0,72-1,92	0,52708	38,2	32,7	1,28	0,67-2,42	0,49954	39,0	30,9	1,43	0,66-3,10	0,43572
*134	12,6	12,9	0,97	0,48-1,96	1,00000	8,8	12,9	0,66	0,24-1,82	0,46116	16,9	18,2	0,92	0,35-2,41	1,00000
*136	21,5	23,1	0,91	0,52-1,59	0,76994	17,6	19,8	0,87	0,39-1,92	0,83812	27,1	29,1	0,91	0,40-2,05	0,83802
*138	8,9	9,5	0,93	0,41-2,08	1,00000	7,4	8,9	0,81	0,26-2,53	0,78078	10,2	14,5	0,67	0,22-2,06	0,57210
*140	4,4	4,1	1,09	0,34-3,47	1,00000	4,4	5,0	0,89	0,20-3,84	1,00000	5,1	1,8	2,89	0,29-28,68	0,61938
*142	0	0,7	0,36	0,01-8,92	1,00000	0	0	-	-	-	0	1,8	0,31	0,01-7,65	0,48378
*144	9,6	8,2	1,20	0,53-2,73	0,67668	10,3	9,9	1,04	0,38-2,89	1,00000	8,5	3,6	2,45	0,46-13,21	0,43656
*146	2,2	4,1	0,53	0,13-2,18	0,50056	1,5	3,0	0,49	0,05-4,79	0,64666	0	5,5	0,13	0,01-2,50	0,11208
*148	13,3	17,0	0,75	0,39-1,45	0,41216	11,8	20,8	0,51	0,21-1,23	0,15036	11,9	7,3	1,72	0,47-6,22	0,52496
*150	5,9	3,4	1,79	0,57-5,61	0,40008	4,4	3,0	1,51	0,30-7,70	0,68792	5,1	3,6	1,42	0,23-8,83	1,00000

Pac: Pacientes; Con: Controles; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; P: Probabilidade; Pc: Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de P multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 13)

TABELA 23 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *RING3CA*

Alelos do Loco <i>RING3CA</i>	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide				
	Pac n=140 %	Con n=149 %	OR	IC 95%	P	Pac n=73 %	Con n=114 %	OR	IC 95%	P	Pac n=59 %	Con n=54 %	OR	IC 95%	P
*223	0	0,7	0,35	0,01-8,72	1,00000	0	0,9	0,51	0,02-12,81	1,00000	0	0	-	-	-
*227	2,9	0,7	4,35	0,48-39,43	0,20186	4,1	0,9	4,84	0,49-47,48	0,29488	1,7	0	2,79	0,11-70,08	1,00000
*229	63,6	56,4	1,35	0,84-2,17	0,23510	64,4	51,8	1,69	0,92-3,08	0,09714	67,8	59,3	1,45	0,67-3,13	0,43292
*231	11,4	13,4	0,83	0,41-1,68	0,72384	12,3	14,9	0,80	0,34-1,91	0,67142	10,2	13,0	0,76	0,24-2,42	0,76674
*233	36,4	47,7	0,63	0,39-1,01	0,05750	39,7	46,5	0,76	0,42-1,38	0,37584	32,2	50,0	0,48	0,22-1,02	0,06330
*235	40,0	40,3	0,99	0,62-1,58	1,00000	39,7	43,9	0,84	0,46-1,53	0,63720	33,9	37,0	0,87	0,40-1,89	0,84550
*237	9,3	17,4	0,48	0,24-0,99	0,05304	5,5	14,0	0,36	0,11-1,11	0,09088	15,3	18,5	0,79	0,30-2,13	0,80568
*239	2,1	2,7	0,79	0,17-3,61	1,00000	1,4	2,6	0,51	0,05-5,04	1,00000	3,4	3,7	0,91	0,12-6,71	1,00000

**Pac:** Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 8)

TABELA 24 - COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM PFE E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *TAPICA*

Alelos do Loco <i>TAPICA</i>	Amostra Total					Amostra Caucasóide					Amostra Negróide				
	Pac n=141 %	Con n=158 %	OR	IC 95%	P	Pac n = 73 %	Con n=116 %	OR	IC 95%	P	Pac n=60 %	Con n=60 %	OR	IC 95%	P
*187	3,5	5,7	0,61	0,20-1,86	0,41614	5,5	2,6	2,18	0,47-10,05	0,43790	1,7	10,0	0,15	0,02-1,31	0,11586
*189	0	1,3	0,22	0,01-4,65	0,50138	0	0,9	0,52	0,02-13,03	1,00000	0	0	-	-	-
*191	62,4	70,9	0,68	0,42-1,11	0,14322	60,3	71,6	0,60	0,33-1,12	0,11082	68,3	71,7	0,85	0,39-1,86	0,84358
*193	71,6	62,0	1,55	0,95-2,52	0,08974	72,6	61,2	1,68	0,89-3,17	0,12730	70,0	65,0	1,26	0,58-2,70	0,69858
*201	11,3	8,2	1,43	0,66-3,08	0,43468	8,2	7,8	1,06	0,36-3,13	1,00000	10,0	6,7	1,56	0,42-5,82	0,73652
*203	6,4	7,6	0,83	0,34-2,03	0,82372	4,1	10,3	0,37	0,10-1,36	0,15952	10,0	6,7	1,56	0,42-5,82	0,74496
*205	1,4	1,9	0,74	0,12-4,51	1,00000	2,7	2,6	1,06	0,17-6,51	1,00000	0	1,7	0,33	0,01-8,21	1,00000
*207	5,7	10,1	0,53	0,22-1,29	0,20218	5,5	11,2	0,46	0,14-1,47	0,19948	6,7	6,7	1,00	0,24-4,20	1,00000
*209	0	0,6	0,37	0,01-9,18	1,00000	0	0,9	0,52	0,02-13,03	1,00000	0	0	-	-	-

**Pac:** Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds Ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de alelos analisados, ou seja, 9)

#### 4.4 ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS DOS GENES *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* E DO LOCO MICROSSATÉLITE *G51152*

A análise das frequências dos haplótipos de variantes dos genes *DRB1*, *DQA1*, *DQB1* e do microssatélite *G51152* foi realizada na amostra total. Foram utilizados os dados das tipificações do loco *G51152* do presente estudo, os dados das tipificações do gene *DRB1* obtidos por PAVONI et al. (2003) e os das tipificações dos genes *DQA1* e *DQB1* realizadas por ROXO (2003).

Os resultados da análise das frequências haplotípicas revelam uma associação positiva entre o haplótipo *DRB1\*0102\_DQA1\*0101\_DQB1\*0501\_G51152\*227* e o PFE (OR = 8,09) (tabela 25). A comparação das frequências dos haplótipos dos genes *DQA1*, *DQB1* e do loco *G51152*, entre os pacientes e controles (tabela 26), evidencia uma associação positiva com o haplótipo *DQA1\*0101\_DQB1\*0501\_G51152\*227* (OR = 6,74). Quanto aos haplótipos de *DRB1* e *G51152* (tabela 27), observam-se associações positivas com *DRB1\*01\_G51152\*227* (OR = 40,35), *DRB1\*0102\_G51152\*227* (OR = 5,64) e *DRB1\*04\_G51152\*227* (OR = 15,65).

As frequências dos haplótipos *DRB1\*0701\_DQA1\*0201\_DQB1\*02\_G51152\*215* e *DRB1\*1101\_DQA1\*0501\_DQB1\*0301\_G51152\*215* foram menores nos pacientes do que nos controles (tabela 25), e as diferenças foram estatisticamente significantes (OR = 0,06 e 0,05, respectivamente). Outras associações negativas foram observadas com o haplótipo *DQA1\*0201\_DQB1\*02\_G51152\*215* (OR = 0,06) (tabela 26); e com os haplótipos *DRB1\*0301\_G51152\*217* (OR = 0,23), *DRB1\*0701\_G51152\*215* (OR = 0,08) e *DRB1\*1101\_G51152\*215* (OR = 0,06) (tabela 27).

TABELA 25 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS LOCOS *G51152*, *DRB1*, *DQA1* E *DQB1* ENTRE PACIENTES COM PFE E CONTROLES

Haplótipos <i>DRB1_DQA1_DQB1_G51152</i>	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P	Pc
	2n (160)	%	2n (274)	%				
*01 - *0101 - *0501 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0101 - *01 - *03 - *245	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0101 - *0101 - *0501 - *193	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0101 - *0101 - *0501 - *223	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0101 - *0101 - *0501 - *227	4	2,5	0	0	15,79	0,84-295,16	<b>0,01786</b>	<b>0,35720</b>
*0101 - *0101 - *0501 - *245	9	5,6	13	4,7	1,20	0,50-2,87	0,65958	
*0101 - *0102 - *06 - *245	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0101 - *0401 - *0501 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *01 - *0301 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *0101 - *05 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
<b>*0102 - *0101 - *0501 - *227</b>	<b>28</b>	<b>17,5</b>	<b>7</b>	<b>2,6</b>	<b>8,09</b>	<b>3,44 - 19,01</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>
*0103 - *0101 - *0501 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0103 - *0101 - *0501 - *245	3	1,9	2	0,7	2,60	0,43 - 15,72	0,35968	
*0301 - *05 - *02 - *217	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0301 - *0501 - *02 - *217	1	0,6	18	6,6	0,09	0,01 - 0,68	<b>0,00286</b>	<b>0,05720</b>
*0301 - *0501 - *0201 - *217	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0301 - *0501 - *0301 - *217	0	0	1	0,4	na	na	na	
030101 - *0502 - *0502 - *193	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0302 - *0401 - *02 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0302 - *0401 - *0402 - *227	6	3,8	4	1,5	2,63	0,73 - 9,46	0,17936	
*0302 - *0501 - *0501 - *211	0	0	1	0,4	na	na	na	
*04 - *03 - *0301 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*04 - *03 - *0302/03 - *227	2	1,3	1	0,4	na	na	na	
*0401 - *03 - *0301 - *215	1	0,6	3	1,1	na	na	na	
*0401 - *03 - *0301 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0402 - *03 - *03 - *227	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0402 - *03 - *0302/03 - *227	2	1,3	1	0,4	na	na	na	
*0403 - *03 - *02 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0403 - *03 - *0302/03 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0404 - *03 - *03 - *227	4	2,5	2	0,7	3,49	0,63 - 19,26	0,20114	
*0404 - *03 - *0301 - *227	4	2,5	3	1,1	2,32	0,51 - 10,48	0,43250	
*0404 - *03 - *0302/03 - *227	3	1,9	4	1,5	na	na	na	
*0404 - *03 - *0402 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0404 - *03 - *0501 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0404 - *03 - *0602 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0405 - *0101 - *0302/03 - *227	2	1,3	0	0	na	na	na	
*0405 - *03 - *02 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0405 - *03 - *0301 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0405 - *03 - *0501 - *195	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0405 - *05 - *0301 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0406 - *0102 - *0301 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0407 - *03 - *03 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0407 - *03 - *0301 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0407 - *03 - *0302/03 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0408 - *03 - *0301 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0410 - *03 - *0501 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0410 - *03 - *02 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0411 - *03 - *03 - *227	1	0,6	2	0,7	na	na	na	
*0411 - *03 - *0302/03 - *227	7	4,4	7	2,6	1,75	0,60 - 5,07	0,40482	
<b>*0701 - *0201 - *02 - *215</b>	<b>1</b>	<b>0,6</b>	<b>28</b>	<b>10,2</b>	<b>0,06</b>	<b>0,01 - 0,41</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>
*0701 - *0201 - *0201 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0701 - *0201 - *03 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0701 - *0201 - *0302/03 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0701 - *0201 - *0301 - *215	0	0	3	1,1	na	na	na	
*0701 - *03 - *02 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0701 - *03 - *02 - *217	0	0	1	0,4	na	na	na	
*08 - *0102 - *0301 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	

-continua-

-continuação-								
Haplótipos	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P	Pc
DRBI_DQAI_DQBI_G51152	2n (160)	%	2n (274)	%				
*08 - *0102 - *0301 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0801 - *0401 - *0402 - *223	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0802 - *0101 - *0102 - *221	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0802 - *0401 - *0402 - *227	0	0	9	3,3	0,09	0,01-1,51	<b>0,02850</b>	<b>0,57000</b>
*0803 - *0401 - *0301 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0803 - *0501 - *0301 - *207	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0804 - *0401 - *0301 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0804 - *0401 - *0402 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0804 - *0501 - *0301 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0807 - *0401 - *0402 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0807 - *0401 - *0402 - *227	2	1,3	0	0	na	na	na	
*09012 - *03 - *02 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*09012 - *03 - *0302/03 - *195	0	0	1	0,4	na	na	na	
*09012 - *03 - *0302/03 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1001 - *0101 - *0501 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1001 - *0101 - *0501 - *227	4	2,5	6	2,2	1,15	0,32 - 4,12	1,00000	
*1101 - *0102 - *0602 - *221	0	0	3	1,1	na	na	na	
*1101 - *05 - *0301 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1101 - *0501 - *0301 - *211	0	0	1	0,4	na	na	na	
<b>*1101 - *0501 - *0301 - *215</b>	0	0	17	6,2	<b>0,05</b>	<b>0,00-0,77</b>	<b>0,00022</b>	<b>0,00440</b>
*1101 - *0501 - *0302/03 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1102 - *0501 - *0301 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1103 - *0501 - *0301 - *215	0	0	3	1,1	na	na	na	
*1104 - *0101 - *0501 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1104 - *03 - *0302/03 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1104 - *0501 - *0301 - *207	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1104 - *0501 - *0301 - *215	0	0	6	2,2	0,13	0,01-2,30	0,08978	
*1104 - *0501 - *0301 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1201 - *0101 - *0501 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1201 - *0102 - *0602 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1201 - *0501 - *0301 - *215	2	1,3	1	0,4	na	na	na	
*1202 - *0102 - *0602 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*13 - *0401 - *0304 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1301 - *0101 - *0501 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1301 - *0102 - *06 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1301 - *0102 - *0605 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1301 - *0103 - *0602 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1301 - *0103 - *0603 - *223	0	0	10	3,6	0,08	0,00-1,35	<b>0,01776</b>	<b>0,35520</b>
*1301 - *0103 - *0603 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1301 - *0103 - *0603 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1301 - *03 - *0302/03 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1302 - *0101 - *06 - *221	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1302 - *0102 - *02 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0501 - *193	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0501 - *215	1	0,6	1	0,4	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0501 - *221	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0501 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0501 - *245	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1302 - *0102 - *06 - *215	0	0	3	1,1	na	na	na	
*1302 - *0102 - *06 - *221	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0602 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0604 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0604 - *221	1	0,6	1	0,4	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0605 - *221	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1302 - *0102 - *0605 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1302 - *0301 - *0301 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1303 - *0103 - *0302/03 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1303 - *0501 - *0301 - *215	0	0	3	1,1	na	na	na	
*1401 - *0101 - *02 - *219	0	0	1	0,4	na	na	na	

-continua-

-conclusão-								
Haplótipos	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P	Pc
DRB1_DQAI_DQBI_G51152	2n (160)	%	2n (274)	%				
*1401 - *0101 - *05031 - *219	0	0	3	1,1	na	na	na	
*1401 - *0101 - *05031 - *223	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1401 - *03 - *05031 - *219	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1402 - *0501 - *0301 - *207	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1402 - *0501 - *0301 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1402 - *0501 - *0301 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1402 - *0501 - *0301 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1404 - *0402 - *0501 - *219	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1406 - *0501 - *0301 - *215	4	2,5	0	0	15,79	0,84-295,16	<b>0,01906</b>	<b>0,38120</b>
*15 - *0102 - *06 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1501 - *0101 - *0501 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1501 - *0101 - *0501 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1501 - *0101 - *0602 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1501 - *0102 - *03 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1501 - *0102 - *0501 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1501 - *0102 - *0602 - *223	2	1,3	12	4,4	0,28	0,06 - 1,25	0,09156	
*1501 - *0102 - *0602 - *227	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1501 - *0103 - *0601 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1502 - *0102 - *06 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1502 - *0103 - *0601 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1503 - *0102 - *02 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1503 - *0102 - *0602 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1503 - *0102 - *0602 - *221	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1503 - *0102 - *0602 - *223	5	3,1	8	2,9	1,07	0,34 - 3,34	1,00000	
*1503 - *0102 - *0602 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1503 - *0102 - *0603 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1601 - *0102 - *05 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1601 - *0102 - *0502 - *215	6	3,6	6	2,2	1,74	0,55 - 5,49	0,36640	
*1601 - *0102 - *0502 - *245	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1602 - *0102 - *02 - *217	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1602 - *0102 - *0502 - *193	0	0	1	0,4	na	na	na	
*1602 - *0102 - *0502 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*1602 - *0501 - *0301 - *215	7	4,4	6	2,2	2,04	0,67 - 6,19	0,23986	

**OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de P multiplicado pelo número de haplótipos analisados, ou seja, 20); na: não analisado porque a frequência em ambos os grupos foi inferior a 2%.

TABELA 26 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS LOCOS *G51152*, *DQA1* E *DQB1* ENTRE PACIENTES COM PFE E CONTROLES

Haplótipos	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P	Pc
<i>DQA1_DQB1_G51152</i>	2n = 160	%	2n = 276	%				
*01 - *03 - *245	1	0,6	0	0	na	na	na	
*01 - *0301 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*01 - *05 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0101 - *02 - *219	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0101 - *0501 - *193	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0101 - *0501 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0101 - *0501 - *223	5	3,1	2	0,7	4,42	0,85 - 23,05	0,10712	
<b>*0101 - *0501 - *227</b>	40	24,9	13	4,7	<b>6,74</b>	<b>3,48 - 13,07</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>
*0101 - *0501 - *245	10	6,3	17	6,2	1,02	0,45 - 2,28	1,00000	
*0101 - *0503 - *219	1	0,6	3	1,1	na	na	na	
*0101 - *05031 - *223	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0101 - *06 - *245	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0101 - *0602 - *217	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0101 - *0602 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *02 - *217	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *02 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *02 - *217	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *02 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0301 - *227	1	0,6	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0304 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *05 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *0501 - *193	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *0501 - *215	3	1,9	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0501 - *221	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *0501 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0502 - *193	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0502 - *215	6	3,8	6	2,2	1,75	0,56 - 5,53	0,37122	
*0102 - *0502 - *245	2	1,2	0	0	na	na	na	
*0102 - *06 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *06 - *221	1	0,6	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *06 - *223	0	0	5	1,6	na	na	na	
*0102 - *0602 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0102 - *0602 - *221	1	0,6	3	1,1	na	na	na	
*0102 - *0602 - *223	8	5,0	21	7,6	0,64	0,28 - 1,48	0,32822	
*0102 - *0602 - *227	3	1,9	2	0,7	na	na	na	
*0102 - *0603 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0604 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0604 - *221	1	0,6	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0605 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0102 - *0605 - *221	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0102 - *0605 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0103 - *0302/03 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0103 - *0601 - *215	0	0	3	1,1	na	na	na	
*0103 - *0602 - *223	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0103 - *0603 - *223	0	0	10	3,6	0,08	0,00 - 1,36	<b>0,01640</b>	<b>0,22960</b>
*0103 - *0603 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0103 - *0603 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
<b>*0201 - *02 - *215</b>	1	0,6	28	10,1	<b>0,06</b>	<b>0,01 - 0,41</b>	<b>0,00004</b>	<b>0,00056</b>
*0201 - *03 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0201 - *0201 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0201 - *0301 - *215	0	0	3	1,1	na	na	na	
*0201 - *0302/03 - *215	1	0,6	0	0	na	na	na	
*03 - *02 - *215	1	0,6	3	1,1	na	na	na	
*03 - *02 - *227	0	0	2	0,7	na	na	na	
*03 - *03 - *227	4	2,5	6	2,2	1,15	0,32 - 4,15	1,00000	

-continua-

-conclusão-

Haplótipos	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P	Pc
<i>DQA1_DQB1_G51152</i>	2n = 160	%	2n = 276	%				
*03 - *03 - *245	1	0,6	1	0,4	na	na	na	
*03 - *0301 - *215	1	0,6	10	3,6	0,17	0,02 - 1,32	0,06170	
*03 - *0301 *227	4	2,5	4	1,4	1,74	0,43 - 7,07	0,47610	
*03 - *0302/03- *195	1	0,6	1	0,4	na	na	na	
*03 - *0302/03 - *227	16	10,0	16	5,8	1,81	0,88 - 3,72	0,12408	
*03 - *0302/03 - *245	1	0,6	0	0	na	na	na	
*03 - *0402 - *227	1	0,6	0	0	na	na	na	
*03 - *0501 - *227	2	1,2	0	0	na	na	na	
*03 - *0602 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0301 - *0301 - *223	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0401 - *02 - *227	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0401 - *0301 - *215	1	0,6	3	1,1	na	na	na	
*0401 - *0402 - *215	0	0	3	1,1	na	na	na	
*0401 - *0402 - *221	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0401 - *0402 - *223	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0401 - *0402 - *227	8	5,0	12	4,3	1,16	0,46 - 2,90	0,81238	
*0402 - *0501/03 - *219	1	0,6	0	0	na	na	na	
*05 - *02 - *217	1	0,6	0	0	na	na	na	
*05 - *0301 - *215	0	0	1	0,4	na	na	na	
*05 - *0302/03 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0501 - *02 - *217	1	0,6	19	6,9	0,09	0,01 - 0,64	<b>0,00190</b>	<b>0,02660</b>
*0501 - *0201 - *217	1	0,6	0	0	na	na	na	
*0501 - *0301 - *207	0	0	4	1,4	na	na	na	
*0501 - *0301 - *211	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0501 - *0301 - *215	15	9,4	38	13,8	0,65	0,34 - 1,22	0,22818	
*0501 - *0301 - *217	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0501 - *0301 - *223	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0501 - *0301 - *245	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0501 - *0501 - *211	0	0	1	0,4	na	na	na	
*0502 - *0502 - *193	1	0,6	0	0	na	na	na	

**OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de *P* multiplicado pelo número de haplótipos analisados, ou seja, 14); na: não analisado porque a frequência em ambos os grupos foi inferior a 2%.

TABELA 27 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS LOCOS *G51152* E *DRB1* ENTRE PACIENTES COM PFE E CONTROLES

Haplótipos <i>DRB1_G51152</i>	Pacientes		Controles		OR	IC 95 %	P	Pc
	2n = 258	%	2n = 296	%				
*01 - *223	1	0,4	0	0	na	na	na	
<b>*01 - *227</b>	16	6,2	0	0	<b>40,35</b>	<b>2,41 - 676,01</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>
*01 - *245	9	3,5	1	0,3	10,66	1,4 - 84,74	<b>0,00668</b>	<b>0,13360</b>
*0101 - *193	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0101 - *215	2	0,8	0	0	na	na	na	
*0101 - *221	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0101 - *223	0	0	3	1,0	na	na	na	
*0101 - *227	3	1,2	0	0	na	na	na	
*0101 - *245	12	4,6	14	4,7	0,98	0,45 - 2,16	1,00000	
*0102 - *215	1	0,4	0	0	na	na	na	
<b>*0102 - *227</b>	31	11,9	7	2,4	<b>5,64</b>	<b>2,44 - 13,04</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>
*0102 - *245	2	0,8	0	0	na	na	na	
*0103 - *215	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0103 - *245	3	1,2	2	0,7	na	na	na	
<b>*0301 - *217</b>	5	2,0	23	7,8	<b>0,23</b>	<b>0,09 - 0,63</b>	<b>0,00212</b>	<b>0,04240</b>
*030101 - *193	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0302 - *211	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0302 - *227	9	3,5	6	2,0	1,75	0,61 - 4,98	0,30652	
*04 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
<b>*04 - *227</b>	13	5,0	1	0,3	<b>15,65</b>	<b>2,03 - 120,51</b>	<b>0,00038</b>	<b>0,00760</b>
*0401 - *215	1	0,4	3	1,0	na	na	na	
*0401 - *227	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0402 - *227	3	1,2	3	1,0	na	na	na	
*0403 - *227	1	0,4	1	0,3	na	na	na	
*0404 - *227	18	7,0	10	3,4	2,15	0,97 - 4,74	0,07440	
*0405 - *195	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0405 - *215	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0405 - *227	2	0,8	2	0,7	na	na	na	
*0405 - *245	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0406 - *223	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0406 - *227	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0407 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0407 - *227	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0407 - *245	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0408 - *215	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0410 - *227	1	0,4	1	0,3	na	na	na	
*0411 - *227	8	3,1	9	3,0	1,02	0,39 - 2,68	1,00000	
*07 - *215	1	0,4	4	1,4	na	na	na	
<b>*0701 - *215</b>	3	1,2	36	12,2	<b>0,08</b>	<b>0,03 - 0,28</b>	<b>&lt; 10<sup>-6</sup></b>	<b>&lt; 10<sup>-4</sup></b>
*08 - *215	1	0,4	0	0	na	na	na	
*08 - *219	1	0,4	0	0	na	na	na	
*08 - *227	3	1,2	1	0,3	na	na	na	
*0801 - *219	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0802 - *223	1	0,4	2	0,7	na	na	na	
*0802 - *227	0	0	9	3,0	0,06	0,00 - 1,01	<b>0,00430</b>	<b>0,08600</b>
*0803 - *207	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0803 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*0804 - *215	1	0,4	3	1,0	na	na	na	
*0804 - *227	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0804 - *245	1	0,4	0	0	na	na	na	
*0807 - *215	0	0	1	0,3	na	na	na	
*0807 - *227	2	0,8	0	0	na	na	na	
*09012 - *195	0	0	1	0,3	na	na	na	
*09012 - *215	1	0,4	3	1,0	na	na	na	
*1001 - *223	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1001 - *227	4	1,6	6	2,0	0,76	0,21 - 2,73	0,75708	

-continua-

## -conclusão-

Haplótipos	Pacientes		Controles		OR	IC 95 %	P	Pc
<i>DRBI_G51152</i>	2n = 258	%	2n = 296	%				
*11 - *215	2	0,8	2	0,7	na	na	na	
*1101 - *211	0	0	1	0,3	na	na	na	
<b>*1101 - *215</b>	1	0,4	17	5,7	<b>0,06</b>	<b>0,01 - 0,48</b>	<b>0,00022</b>	<b>0,00440</b>
*1101 - *217	0	0	1	0,3	na	na	na	
*1101 - *221	0	0	3	1,0	na	na	na	
*1102 - *215	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1103 - *215	0	0	3	1,0	na	na	na	
*1104 - *207	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1104 - *215	0	0	7	2,4	0,07	0,00 - 1,31	<b>0,01754</b>	<b>0,35080</b>
*1104 - *223	1	0,4	1	0,3	na	na	na	
*12 - *245	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1201 - *215	2	0,8	1	0,3	na	na	na	
*1201 - *227	1	0,4	1	0,3	na	na	na	
*1202 - *223	1	0,4	0	0	na	na	na	
*13 - *215	3	1,2	1	0,3	na	na	na	
*13 - *221	1	0,4	0	0	na	na	na	
*13 - *223	0	0	1	0,3	na	na	na	
*13 - *245	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1301 - *215	0	0	1	0,3	na	na	na	
*1301 - *223	2	0,8	13	4,4	0,17	0,04 - 0,76	<b>0,00774</b>	<b>0,15480</b>
*1301 - *227	1	0,4	1	0,3	na	na	na	
*1301 - *245	0	0	1	0,3	na	na	na	
*1302 - *193	2	0,8	0	0	na	na	na	
*1302 - *215	1	0,4	3	1,0	na	na	na	
*1302 - *221	3	1,2	4	1,4	na	na	na	
*1302 - *223	0	0	3	1,0	na	na	na	
*1302 - *227	2	0,8	0	0	na	na	na	
*1302 - *245	1	0,4	2	0,7	na	na	na	
*1303 - *215	0	0	4	1,4	na	na	na	
*14 - *195	1	0,4	1	0,3	na	na	na	
*14 - *215	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1401 - *219	2	0,8	4	1,4	na	na	na	
*1401 - *223	0	0	2	0,7	na	na	na	
*1402 - *207	0	0	1	0,3	na	na	na	
*1401 - *227	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1402 - *215	0	0	1	0,3	na	na	na	
*1402 - *217	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1402 - *223	0	0	1	0,3	na	na	na	
*1402 - *245	0	0	1	0,3	na	na	na	
*1404 - *219	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1406 - *215	4	1,6	0	0	na	na	na	
*15 - *215	1	0,4	0	0	na	na	na	
*15 - *223	3	1,2	2	0,7	na	na	na	
*1501 - *215	3	1,2	1	0,3	na	na	na	
*1501 - *223	6	2,3	13	4,4	0,52	0,19 - 1,38	0,23388	
*1501 - *227	1	0,4	2	0,7	na	na	na	
*1502 - *215	0	0	3	1,0	na	na	na	
*1503 - *221	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1503 - *223	5	1,9	10	3,4	0,57	0,19 - 1,68	0,43814	
*1503 - *227	2	0,8	0	0	na	na	na	
*16 - *215	6	2,3	0	0	15,27	0,86 - 272,32	<b>0,00982</b>	<b>0,19640</b>
*16 - *227	1	0,4	0	0	na	na	na	
*16 - *245	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1601 - *215	8	3,0	6	2,0	1,55	0,53 - 4,52	0,43274	
*1601 - *245	1	0,4	0	0	na	na	na	
*1602 - *193	0	0	1	0,3	na	na	na	
*1602 - *215	10	3,9	6	2,0	1,95	0,70 - 5,44	0,20878	
*1602 - *217	2	0,8	0	0	na	na	na	

**OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade; **Pc:** Probabilidade com correção de Bonferroni (valor de P multiplicado pelo número de haplótipos analisados, ou seja, 20); na: não analisado porque a frequência em ambos os grupos foi inferior a 2%.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O pênfigo foliáceo endêmico é uma doença auto-imune caracterizada clinicamente por bolhas e erosões cutâneas decorrentes da perda progressiva de adesão entre os queratinócitos. No entanto, o mecanismo subjacente a este processo acantolítico não está esclarecido. A presença de anticorpos patogênicos antiepidérmicos, cujo alvo é a desmogleína-1, é a característica imunológica marcante desta doença. A participação da imunidade celular nas lesões do PFE ainda está sendo investigada, mas a presença de células T CD4+, que expressam um padrão de citocinas sugestivo de resposta Th2, é evidenciada no infiltrado inflamatório das lesões e no sangue periférico dos pacientes com PFE (LIN et al., 2000; CAPRONI et al., 2001; SANTI e SOTTO, 2001). Estas células T CD4+ encontradas no sangue periférico mostram uma resposta específica ao mesmo auto-antígeno reconhecido pelos anticorpos e restrita por moléculas HLA-DR.

Estudos epidemiológicos mostram que as manifestações clínicas do PFE, as quais coincidem com a elevação dos títulos de auto-anticorpos da subclasse IgG4 (ROCK et al., 1989), e a produção de anticorpos específicos para o primeiro e segundo domínios externos da *dsg-1* (LI et al., 2003) são dependentes da ação de fatores ambientais (WARREN et al., 2000) em indivíduos geneticamente suscetíveis. Várias são as evidências de fatores genéticos de suscetibilidade e de proteção ao PFE: a maior incidência da doença entre parentes consangüíneos dos probandos; as associações encontradas inicialmente com especificidades sorológicas HLA-DR e DQ (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989) e, depois, com certos alelos, genótipos e haplótipos dos genes *HLA-DRB1* e *HLA-DQA1* e *DQB1* (PAVONI et al., 2003; ROXO, 2003). Entretanto, alguns residentes em áreas endêmicas são portadores de alelos HLA associados com predisposição ao PFE e não manifestam a doença, e outros não têm as referidas variantes e apresentam as manifestações clínicas. Isto demonstra, de modo similar às outras doenças complexas, que outros genes também estão envolvidos na determinação da suscetibilidade ao PFE.

Devido à ampla gama de atividades biológicas exercidas pelas citocinas, que incluem desde funções na imunidade inata até diferentes fases da resposta imune específica, os genes que as codificam são fortes candidatos de predisposição ao PFE. Estas moléculas imunomoduladoras estão implicadas na patogênese de muitas doenças decorrentes de alterações na resposta imune, seja pela sua produção excessiva, seja pela sua deficiência. Muitos polimorfismos identificados nos genes que codificam as citocinas parecem controlar, pelo menos em parte, os seus níveis de transcrição. Por esta razão, a análise da variabilidade destes genes é de fundamental importância para a compreensão da patogênese e da expressão clínica das doenças multifatoriais. No presente estudo, investigamos a variabilidade de alguns destes genes, em pacientes e controles, com o objetivo de identificar outros fatores genéticos que sejam determinantes da suscetibilidade ao PFE. Além disto, investigamos também outras regiões do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) que pudessem conter genes, além dos genes *HLA*, envolvidos na fisiopatologia desta doença, por meio do mapeamento baseado na associação com variantes de locos microssatélites.

## 5.2 GENE *TNF* E COMPLEXO GÊNICO DA *IL1*

Incluimos neste estudo os genes *TNF*, *IL1A*, *IL1B*, além de seu respectivo antagonista *IL1RN*, por estarem envolvidos na mediação e na regulação dos processos inflamatórios. A análise imunohistoquímica da epiderme lesionada do PF e do PV mostrou, além de células T CD4+, a presença de granulócitos e mastócitos ativados, indicando a participação deste infiltrado inflamatório na formação das bolhas acantolíticas (CAPRONI et al., 2001). Vários estudos têm sugerido o envolvimento destas citocinas inflamatórias na acantólise. A presença de transcritos dos genes *TNF* e *IL6* nas células que circundam as bolhas acantolíticas foi detectada em vários tipos de pênfigo, mostrando maior expressão no PFE (LÓPEZ-ROBLES et al., 2001). Nas lesões do PV também foi evidenciada a expressão aumentada de *TNF* e de *IL1A* (FELICIANI et al., 2000). Segundo estes autores, camundongos com deficiência de IL-1 ou de TNF $\alpha$  são menos suscetíveis aos efeitos da transferência passiva de IgG patogênica do PV; e a combinação de anticorpos anti-IL-1 e anti-TNF $\alpha$  inibe a acantólise, induzida pela IgG do PV, de queratinócitos cultivados *in vitro*.

Níveis elevados de IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  e de outros elementos inflamatórios foram encontrados no fluido das bolhas epidérmicas e no sangue periférico de pacientes com PV e com penfigóide bolhoso (GRANDO et al., 1989; D'ÁURIA et al., 1997; 1999). Em indivíduos com PV, foi demonstrada uma correlação entre aumento dos níveis séricos de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e diminuição de IL-1Ra com a atividade da doença, enquanto os níveis destas citocinas e de seu antagonista foram comparáveis aos dos controles normais na fase de remissão clínica (BHOL et al., 2000).

Apesar dessas indicações da participação do *TNF* nas lesões do pênfigo, um estudo realizado por ROXO et al. (2003) não demonstrou haver correlação entre as variantes de *TNF* -863 e *TNF* -308 e o aumento de predisposição ou resistência ao PFE. Foi observada somente uma associação negativa muito fraca com o alelo -238 A. Contudo, estes resultados não excluem a possível influência destas variantes do TNF $\alpha$  na patogênese desta doença. Estes polimorfismos ainda devem ser estudados em diferentes populações e grupos étnicos, e em amostras maiores, para a verificação de possíveis interações gênicas.

Buscamos identificar novos polimorfismos que pudessem influir na regulação dos níveis de expressão do *TNF* num fragmento de aproximadamente 2 Kb de DNA, situado a montante da posição -1031 deste gene, pois a variabilidade desta região do gene *TNF* ainda não havia sido investigada. Encontramos mutações nas posições -1491 (T  $\rightarrow$  A), -1391 (C  $\rightarrow$  T), -1226 (T  $\rightarrow$  C) e -1380 (G  $\rightarrow$  C). Embora tenhamos encontrado novas variantes nesta região, elas não são marcadores genéticos úteis porque se mostraram pouco freqüentes nas células de referência analisadas. Por esta razão, não investigamos suas possíveis associações com o PFE uma vez que o tamanho da amostra não possibilitaria a obtenção de resultados estatisticamente confiáveis. Além disto, os fatores genéticos de suscetibilidade às doenças complexas, que têm impacto em nível de população, são variantes polimórficas com freqüências mais elevadas.

Em relação ao complexo gênico da interleucina-1, determinamos a prevalência das variantes dos polimorfismos *IL1A* -889, *IL1B* -511e +3954, *IL1RN* nt 9261 em um grupo de pacientes caucasóides brasileiros com pênfigo foliáceo endêmico e em seus controles. Não observamos diferenças significativas quanto às freqüências dos portadores dessas variantes alélicas, e tampouco nas respectivas freqüências genótípicas e alélicas, entre os pacientes e controles. Não houve sequer associações com os haplótipos constituídos pelos polimorfismos *IL1A* -889, *IL1B* -511, *IL1B* +3954 e *IL1RN* +9261. Estes resultados sugerem que as variantes destes polimorfismos não constituem fatores genéticos de

resistência ou predisposição ao PFE nesta população de caucasóides brasileiros.

As frequências alélicas e genóticas do polimorfismo -889 do gene *IL1A* de nossos controles caucasóides são similares às encontradas em finlandeses (WANG et al., 2001; LUOMALA et al., 2001), noruegueses (McDOWELL et al., 1995) e numa amostra de caucasóides europeus (HODJE et al., 2001). Em relação às frequências das variantes e genótipos de *IL1B* -511, os nossos resultados apresentam semelhança aos encontrados em caucasóides finlandeses (HURME e HELMINEN, 1998; WANG et al., 2001; LUOMALA et al., 2001) e caucasóides norte-americanos (TSENG et al., 2002a). Ao contrário do observado nos caucasóides deste e de outros estudos, nos hindus de origem Gujarati a frequência do alelo C do polimorfismo *IL1B* -511 é inferior à do alelo T (WILKINSON et al., 1999). Estes resultados diferem dos nossos quanto às frequências dos alelos ( $P = 0,00192$ ) e dos genótipos ( $P = 0,00744$ ). Também em asiáticos de Taiwan, a frequência do alelo *IL1B* -511 C é inferior à da população por nós investigada (TSENG et al., 2002a), embora as frequências alélicas ( $P = 0,06562$ ) e genóticas ( $P = 0,11188$ ) não difiram significativamente daquelas de nossa amostra.

Quanto ao polimorfismo *IL1B* +3954, as frequências alélicas e genóticas nos caucasóides brasileiros são semelhantes às dos caucasóides norte-americanos (TSENG et al., 2002a) e dos hindus Gujarati (WILKINSON et al., 1999). Porém, são distintas daquelas dos caucasóides finlandeses (HURME e HELMINEN, 1998; WANG et al., 2001; LUOMALA et al., 2001; HODJE et al., 2001) e dos taiwaneses, nos quais o alelo *IL1B* +3954 T é raro (0,7%) (TSENG et al., 2002a). Em relação ao nucleotídeo 9261 do gene *IL1RN*, as frequências dos alelos e dos genótipos observadas em nossos caucasóides diferem, com significância estatística, das de caucasóides norte-americanos e de asiáticos de Taiwan (TSENG et al., 2002a).

Apesar de não termos encontrado associações do PFE com as variantes dos genes *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*, seria interessante investigar um possível efeito destes polimorfismos em diferentes grupos de pacientes. Por exemplo, nos que apresentam lesões localizadas e naqueles que manifestam a forma generalizada da doença; entre os pacientes que apresentam remissão espontânea e aqueles que o fazem somente mediante tratamento ou ainda a outros que não respondem à terapia convencional. É plausível supor que as variantes associadas com maior produção destas interleucinas não confirmam predisposição ao PFE, mas influenciem na modulação desta doença.

A ausência de associações com estas variantes não descarta a possibilidade de

outros polimorfismos, localizados em diferentes regiões destes genes, constituírem fatores de proteção ou suscetibilidade ao PFE. Muitas vezes, o efeito de certas combinações de variantes alélicas distribuídas ao longo da extensão do gene, e não apenas variantes isoladas, determina os níveis de transcrição do gene e conseqüentemente influencia a predisposição ou resistência à doença. Um outro aspecto a ser considerado é que as variantes alélicas analisadas neste estudo podem estar associadas ao PFE em outras etnias ou mesmo em outras populações caucasóides.

### 5.3 GENE *IL10*

Variantes polimórficas dos nucleotídeos -1082 e -592 do gene *IL10* foram investigadas em nossa amostra total, que é constituída principalmente de caucasóides e negróides, e em menor proporção de índios e mestiços de índios com caucasóides. Os resultados não demonstraram qualquer associação entre estas variantes e o PFE tanto na amostra total quanto nas subamostras caucasóide e negróide. A ausência de associações entre estas variantes do gene *IL10* e o PFE indica que elas não constituem fatores de risco ou proteção nesta população brasileira.

A análise da distribuição das freqüências haplotípicas não mostrou associações com PFE, exceto nos negróides, nos quais observamos uma associação negativa fraca com o haplótipo -1082 G\_-592 C (OR = 0,49). Nos caucasóides não há sequer tendência desta associação, o que se reflete em ausência de associação na amostra total. Haplótipos com guanina na posição -1082 do gene *IL10* foram correlacionados com maior produção, enquanto aqueles contendo adenina nesta mesma posição mostraram menor produção desta interleucina (TURNER et al., 1997; CRAWLEY et al., 1999). Esta associação negativa fraca, com o haplótipo GC, responsável por alta produção de IL-10, deve ser investigada em amostras de maior tamanho, tanto em negróides como em outras etnias, para esclarecermos se é espúria ou decorrente de interações alélicas de genes presentes neste haplótipo e que influenciam a patogênese do PFE.

A IL-10 favorece a resposta Th2 em conseqüência às suas atividades supressoras da resposta Th1, intensifica a resposta humoral e promove o desvio de classe de imunoglobulinas, mas também inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o TNF $\alpha$  e aumenta a expressão da molécula antiinflamatória IL-1Ra (MOORE et al., 2001). Em geral, a IL-10 exerce um efeito protetor em doenças associadas com

resposta Th1, enquanto contribui na patogênese daquelas com predomínio de respostas Th2 (ASADULLAH et al., 2003). Por exemplo, para o lúpus eritematoso sistêmico (SLE), vários estudos encontraram correlação entre níveis elevados de IL-10 e atividade da doença. Além disto, existem indicações que variantes polimórficas do gene *IL10* associadas com sua alta produção podem predispor ao SLE (GIBSON et al., 2001; BEEBE et al., 2002). No pênfigo foliáceo endêmico, a expressão da IL-10 nas lesões ainda não foi investigada, porém, as concentrações séricas mostraram-se elevadas nos pacientes com manifestações clínicas da doença, sem que haja correlação com as formas localizada e generalizada (ZEOTI et al., 2000). No pênfigo vulgar e no penfigóide bolhoso, a produção exacerbada de IL-10 foi observada no fluido da bolha acantolítica e no soro, e de modo similar ao SLE, as concentrações desta citocina mostraram correlação com atividade e gravidade da doença (SCHMIDT et al., 1996; D'ÁURIA et al., 1999; BHOL et al., 2000).

Entretanto, a influência na IL-10 nestas dermatoses bolhosas não está muito clara, pois alguns resultados conflitantes sugerem que esta citocina atua suprimindo a atividade da doença. Em pacientes com penfigóide bolhoso, foi constatada uma diminuição significativa da frequência de células T CD4+ produtoras de IL-4 e IL-13 em sangue periférico, após terapia sistêmica com corticosteróides (TERAKI et al., 2001). Por outro lado, esses autores observaram um aumento de células secretoras de IL-10, que estava correlacionado com melhora das manifestações clínicas. Esta interleucina também mostrou uma ação supressora da acantólise no modelo murino do pênfigo vulgar, no qual os camundongos com o gene *IL10* nocauteado mostraram maior suscetibilidade à manifestação da doença mediante a transferência passiva de IgG patogênica do PV (TOTO et al., 2000). Segundo estes autores, a administração concomitante de IL-10 recombinante e de IgG do PV, em camundongos, diminuiu a gravidade das manifestações da doença.

Com respeito ao PFE, a correlação entre níveis séricos elevados e manifestações clínicas da doença observada por ZEOTI et al. (2000) é conflitante com a associação negativa entre o PFE e um haplótipo alto produtor de IL-10 (-1082 G\_-592 C) que foi encontrada em nossa amostra negróide. Estudos adicionais, tanto para esclarecer o significado desta associação quanto para investigar a IL-10 nas lesões, bem como o seu efeito em modelos animais de PFE, são necessários para elucidar a participação da IL-10 na patogênese desta doença.

A comparação das frequências alélicas das variantes de *IL10* -1082 da nossa amostra de controles saudáveis com as de populações norte-americanas (COX et al., 2001)

mostra um gradiente interessante. Há uma diminuição do alelo A e conseqüente aumento de G à medida que comparamos os negróides norte-americanos (G = 67%; A = 33%), caucasóides brasileiros (A = 66%; G = 34%), negróides brasileiros (A = 64%; G = 36%) e caucasóides norte-americanos (A = 56%; G = 44%). As frequências observadas nos caucasóides e negróides de nossa população, assim como as dos negróides norte-americanos, são similares. Porém, as frequências encontradas nos caucasóides brasileiros diferem significativamente das observadas nos caucasóides norte-americanos ( $P = 0,02666$ ), e as detectadas nos caucasóides e negróides do nosso estudo mostram diferenças estatisticamente significantes com relação às encontradas nos ingleses, nos chineses (TURNER et al., 1997; REYNARD et al., 2000) e nos italianos (LIO et al., 2001). Nos finlandeses, as frequências destas variantes são similares às dos negróides brasileiros, mas distintas das de nossos caucasóides (WANG et al., 2001).

Com respeito às variantes do polimorfismo -592, as frequências alélicas encontradas nos controles caucasóides e negróides do nosso estudo são similares entre si e às dos negróides norte-americanos. Contudo, mostram diferenças estatisticamente significantes em comparação às observadas em caucasóides norte-americanos (COX et al., 2001), ingleses, chineses (TURNER et al., 1997; REYNARD et al., 2000) e italianos (LIO et al., 2001).

#### 5.4 GENES *IL4* E *IL4R*

Os genes que codificam a IL-4 e a subunidade alfa de seu receptor foram investigados neste estudo principalmente pela influência que exercem na polarização das células Th precursoras em Th2, na ativação e na diferenciação de células B, bem como no desvio de classe de imunoglobulinas (GASCAN et al., 1991; ABBAS et al., 1996; MURPHY et al., 2000).

A análise da amostra total de caucasóides demonstrou uma associação positiva fraca entre o genótipo T/T do polimorfismo *IL4* -590 e o pênfigo foliáceo endêmico. Na análise separada de caucasóides e negróides observou-se a mesma tendência de associação, embora sem significância estatística, possivelmente devido ao menor tamanho das subamostras. Identificamos também uma associação negativa fraca com o alelo C na amostra total, sendo observada somente uma tendência de associação nos caucasóides e negróides, provavelmente pelos pequenos tamanhos amostrais. A frequência do genótipo

C/C mostrou-se menor nos pacientes do que nos controles da amostra total e nos caucasóides, mas esta tendência não foi observada nos negróides. Nestes, contrariando a menor frequência da variante -590 C nos pacientes, a sua frequência em homozigose (C/C) foi maior nos pacientes do que nos controles.

Embora nossos resultados mostrem associações entre as variantes de *IL4* -590 e o PFE, consideramos necessário que seja realizado um estudo em amostra de maior tamanho a fim de esclarecer com precisão a possível influência do genótipo T/T na suscetibilidade, bem como o efeito protetor do alelo C nas diferentes etnias que constituem a população brasileira.

Não excluimos a possibilidade de as variantes de *IL4* -590 associadas ao PFE estarem em desequilíbrio de ligação com alelos de outros genes que seriam os de fato envolvidos na patogênese, sendo *IL4* um mero marcador. Esta hipótese é bastante plausível, pois na região 5q31.1 localizam-se outros genes candidatos, como, por exemplo, o que codifica a IL-13. Entretanto, consideramos possível o seu envolvimento direto na fisiopatologia desta doença. Existem evidências sobre a relevância funcional deste polimorfismo, uma vez que a presença de timina (T) na posição -590 foi associada com aumento da transcrição do gene *IL4* (ROSENWASSER et al., 1995). Esta variante T influencia a predisposição ou a evolução clínica de outras doenças caracterizadas pelo desvio da resposta imune na direção Th2, tais como a dermatite e a asma atópicas (KAWASHIMA et al., 1998; BURCHARD et al., 1999; SANDFORD et al., 2000).

A associação positiva encontrada neste estudo, entre o genótipo T/T e PFE, permite-nos especular que este genótipo possa predispor a uma produção excessiva da IL-4 no início da resposta imune. As quantidades aumentadas desta interleucina, por sua vez, podem favorecer a diferenciação dos clones Th precursores específicos para dsq-1 em células Th2 auto-reativas efectoras. Transcritos de *IL4* e de outras citocinas condizentes com perfil de resposta Th2 foram detectados nas lesões epidérmicas e também em clones de linfócitos T CD4+, específicos para dsq-1, isolados de sangue periférico de pacientes com PFE (LIN et al., 2000; CAPRONI et al., 2001). A investigação dos níveis da IL-4 no soro de pacientes com PFE mostrou que as suas concentrações foram inferiores às dos controles saudáveis (ZEOTI et al., 2000). Entretanto, esse estudo foi realizado em uma amostra pequena constituída de pacientes em diferentes fases da doença. A investigação concomitante da presença da IL-4 nas lesões e no sangue periférico ainda não foi realizada para o PFE, e tampouco para os outros tipos de pênfigo.

Os experimentos de TERAOKI et al. (2001) sugerem a participação da IL-4 na patogênese do penfigóide bolhoso. Eles demonstraram que a frequência de células T CD4+ produtoras de IL-4 e IL-13 no sangue periférico dos pacientes foi maior que a dos controles, e mostrou-se ainda mais elevada nas lesões cutâneas. A maioria destas células pertencia à subpopulação T CD4+, que expressa antígeno associado aos linfócitos cutâneos. Houve uma diminuição considerável da frequência destas células após terapia sistêmica com corticósteróides, concomitante ao aumento da frequência dos clones T CD4+ produtores de IL-10. Apesar de o penfigóide bolhoso diferir dos tipos clássicos de pênfigo (PF e PV) quanto ao antígeno alvo e à localização das lesões, pelas características comuns de suas imunopatologias é plausível esperar-se um perfil semelhante de citocinas.

O desequilíbrio na produção da IL-4 pode também estar implicado na produção dos auto-anticorpos patogênicos do PFE, não somente de modo indireto via estimulação dos clones Th2, mas pela ação direta desta citocina sobre as células B (O’GARRA e ARAI, 2000). A IL-4 induz a proliferação dos linfócitos B, aumenta a sua capacidade de apresentação de antígenos e influencia o desvio de classe de imunoglobulinas de IgM para IgG4 (GASCAN et al., 1991). Porém, a existência de uma correlação entre a variante -590 T do gene IL4 e os níveis séricos de IgG4 patogênica ainda não foi investigada.

As frequências dos alelos C e T do nucleotídeo -590 em nossas subamostras caucasóide (C = 73,5%; T = 26,5%) e negróide (C = 59,8%; T = 40,2%) diferem entre si com significância estatística, mas condizem com os dados de SCAREL-CARMINAGA et al. (2002) em outras amostras da população brasileira. Esses autores mostram um gradiente do alelo C em caucasóides (C = 67,9%), mulatos (58,3%) e negros (C = 30,8%). As frequências de C e T reveladas por SCAREL-CARMINAGA et al. (2002) em sua amostra de negros difere significativamente das frequências encontradas em sua amostra de mulatos, assim como da nossa amostra de negróides. Os japoneses e os árabes também apresentam frequências menores do alelo C em comparação aos caucasóides (24,5% a 34,0%), similares à dos negros e distintas das encontradas em nossos caucasóides e negróides (KAWASHIMA et al., 1998; NOGUCHI et al., 1998; KANEMITSU et al., 1999; HIJAZI e HAIDER, 2000).

Embora o alelo -590 T mostre uma frequência superior à do alelo -590 C em várias populações caucasóides, isso não foi observado em nossa amostra de caucasóides. As frequências das variantes da posição -590 em nossa amostra diferem com significância estatística das encontradas em caucasóides do Reino Unido (HUNT et al., 2000;

HEWARD et al., 2001) e dos Estados Unidos da América (BURCHARD et al., 1999), mas são similares às dos caucasóides da Austrália e de uma outra população do Reino Unido (WALLEY e COOKSON, 1996). Quanto à nossa amostra de negróides, as frequências dos alelos C e T diferem, com significância estatística, das frequências de todas as populações caucasóides, japonesas e árabes supracitadas.

O polimorfismo do nucleotídeo 148, o qual integra o códon 50 do gene do receptor da IL-4 (*IL4R*), pode resultar na codificação do aminoácido isoleucina ou valina dependendo se adenina (A) ou guanina (G) ocupa esta posição, respectivamente. Esta variabilidade genética está correlacionada com a variação da resposta do receptor após sua ligação a IL-4 (MITSUYASU et al., 1998). A variante A, associada a uma resposta mais intensa deste receptor quando comparada à variante G, parece influir na suscetibilidade ou na modulação de doenças com predomínio de resposta Th2, por exemplo, o lúpus eritematoso sistêmico (KANEMITSU et al., 1999) e a asma (MITSUYASU et al., 1998; ROSA-ROSA et al., 1999; TAKABAYASHI et al., 2000).

No presente estudo nenhuma associação significativa foi encontrada entre o pênfigo foliáceo endêmico, que também é caracterizado por resposta Th2, e as variantes do gene *IL4R*. Esta ausência de associações entre *IL4R* e PFE, tanto na amostra total quanto nas subamostras caucasóide e negróide, sugere que estas variantes não conferem um aumento de risco ou proteção a esta doença na população analisada neste estudo. Entretanto, não podemos excluir uma influência da variabilidade deste gene no PFE antes deste e de outros polimorfismos serem investigados em outras populações e em diferentes etnias.

As frequências alélicas e genotípicas das variantes do nucleotídeo 148 de *IL4R*, além de semelhantes entre caucasóides e negróides deste estudo, foram similares às encontradas nos negróides norte-americanos e caucasóides alemães; porém, diferiram com significância estatística das frequências observadas nos caucasóides norte-americanos e nos japoneses (CAGGANA et al., 1999; KANEMITSU et al., 1999; KLEIN et al., 2001).

## 5.5 GENE *IL6*

Nossos resultados com respeito ao polimorfismo da posição -174 do gene *IL6* sugerem um efeito protetor do genótipo C/C, que se apresentou com uma frequência significativamente menor nos pacientes com PFE em comparação aos controles da amostra total (OR = 0,13). Este genótipo manteve uma frequência inferior nos pacientes

caucasóides (OR = 0,18,) e nos negróides (OR=0,19), apesar das diferenças não serem significativas possivelmente pelo menor tamanho destas subamostras. Ao mesmo tempo, encontramos uma associação positiva demonstrada pelo aumento significativo da frequência dos portadores do alelo -174 G nos pacientes da amostra total (OR = 7,66). A mesma tendência de associação foi observada nos caucasóides (OR = 5,63) e nos negróides (OR = 5,25), embora sem significância estatística, possivelmente devido ao pequeno tamanho destas subamostras. Esta associação sugere que a variante -174 G possa atuar como um fator genético de suscetibilidade ao PFE.

O genótipo C/C também se mostrou como um fator de resistência a doenças auto-imunes caracterizadas por um padrão de resposta Th1 e associadas com processos inflamatórios exacerbados. Podemos exemplificar com a diabetes melito do tipo I (JAHROMI et al., 2000) e com a artrite crônica juvenil sistêmica (FISHMAN et al., 1998). Resultados contrários foram observados na artrite reumatóide, na qual a idade média de manifestação da doença foi inferior para o grupo de pacientes C/C em comparação aos que possuem os demais genótipos (PASCUAL et al., 2000). Manifestações clínicas mais brandas da Doença de Gaucher, em judeus Ashkenazi, também foram associadas com o genótipo C/C (ALTARESCU et al., 2003).

A variante alélica -174 G foi associada com suscetibilidade à diabetes melito do tipo I, em caucasóides ingleses (JAHROMI et al., 2000), e com periodontite crônica, em caucasóides brasileiros (TREVILATTO et al., 2003). Apesar de não ter sido associada com predisposição ao lupus eritematoso sistêmico (LES), em caucasóides germânicos, parece influir nas suas manifestações clínicas e imunológicas (SCHOTTE et al., 2001). Num outro estudo envolvendo LES, realizado em uma amostra de judeus Ashkenazi e outros europeus, não foi observada associação com as variantes da posição -174 e sim com alelos de um minisatélite localizado a jusante deste gene (LINKER-ISRAELI et al., 1999). As variantes da posição -174 não mostraram associações significativas com a esclerose múltipla em caucasóides espanhóis (FEDETZ et al., 2001) ou com a espondilite anquilosante nesta mesma etnia (COLLADO-ESCOBAR et al., 2000), e tampouco com a doença inflamatória do intestino em alemães (KLEIN et al., 2001).

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo -174 que obtivemos em nossa amostra de caucasóides foram semelhantes às encontradas em outra população de caucasóides brasileiros (TREVILATTO et al., 2003), em caucasóides norte-americanos (COX et al., 2001), em espanhóis (PASCUAL et al., 2000) e em uma amostra constituída

de judeus Ashkenazi e de não judeus oriundos da Europa Ocidental e Oriental (LINKER-ISRAELI et al., 1999). Porém, diferiram das frequências observadas em caucasóides ingleses (OLOMOLAIYE et al., 1998; JAHROMI et al., 2000), caucasóides finlandeses (WANG et al., 2001; HULKKONEN et al., 2001) e caucasóides germânicos (SCHOTTE et al., 2000). Quanto aos negróides analisados no presente estudo, as frequências dos alelos -174 G e -174 C, bem como dos genótipos constituídos por estas variantes, foram significativamente distintas das dos caucasóides, mas similares às frequências encontradas nos negróides norte-americanos (COX et al., 2001).

As variantes alélicas de -174 estão implicadas em diferenças individuais na transcrição do gene *IL6*. O alelo C foi correlacionado com diminuição da expressão *in vitro*, e com níveis plasmáticos inferiores, enquanto o alelo G foi associado com maior produção desta citocina (FISHMAN et al., 1998; RIVERA-CHAVEZ et al., 2003). A presença de níveis mais elevados de IL-6 nas lesões ou no sangue periférico de várias doenças auto-imunes, bem como a sua participação na indução de auto-imunidade patogênica experimental em modelos animais, sugere seu envolvimento na patogênese destas doenças (ISHIHARA e HIRANO, 2002). Níveis séricos mais elevados da IL-6 foram associados com a atividade da doença e com formas de manifestações mais graves na artrite reumatóide (SACK et al., 1993; MADHOK et al., 1993), na artrite crônica juvenil (DE BENEDETTI et al., 1991) e no lupus eritematoso sistêmico (SPRONK et al., 1992; MEIJER et al., 1993).

Esse aumento de IL-6 também foi observado no plasma de pacientes com dermatoses bolhosas, como o pênfigo paraneoplásico (NOUSARI et al., 1999) e o penfigóide bolhoso (D'AURIA et al., 1999), nos quais apresentou correlação com a extensão das bolhas e erosões epidérmicas. No pênfigo vulgar, os níveis séricos elevados de TNF $\alpha$  e de IL-6 mostraram correlação com os títulos de auto-anticorpos e com a atividade da doença (D'AURIA et al., 1997; AMEGLIO et al., 1999). Estas citocinas pró-inflamatórias também estão presentes nas células das lesões de vários tipos de pênfigo, sendo a expressão mais intensa no pênfigo foliáceo endêmico do que nas outras formas de pênfigo investigadas (LÓPEZ-ROBLES et al., 2001). Ainda não existem relatos sobre as concentrações da IL-6 no soro de pacientes com PFE, mas seria interessante investigar os níveis desta citocina na fase ativa da doença, durante a remissão e na recaída. Tampouco foi investigado se existe correlação entre as variantes de -174 e a expressão desta citocina em sangue periférico ou nas lesões do PFE.

As associações encontradas neste estudo sugerem que o genótipo C/C constitui um fator de resistência e o alelo G um fator de suscetibilidade ao PFE. Com base nestes resultados especulamos que a variante -174 G predispõe ao PFE por possibilitar uma maior produção de IL-6. Devido à sua multiplicidade de funções e à sua expressão em vários tecidos, além das células linfóides, a presença de IL-6 em quantidades elevadas pode contribuir na fisiopatologia do PFE em diferentes fases do processo auto-imune: na intensificação do processo inflamatório com conseqüente exacerbação das lesões epidérmicas; na diferenciação e na manutenção dos clones Th2 auto-reativos; na diferenciação de células B auto-reativas em células plasmáticas; e na modificação do processamento e da apresentação de antígenos pelas células dendríticas, que, por sua vez, favorece o fenômeno de espalhamento de epítomos resultando na produção de anticorpos patogênicos do PFE.

***IL-6 e exacerbação da inflamação com aumento das lesões da epiderme:*** a presença de IL-6 nas lesões do PFE (LÓPEZ-ROBLES et al., 2001) pode induzir a produção de outros mediadores inflamatórios, inclusive o terceiro componente do complemento (C3). Embora tenha sido demonstrado que a presença do complemento não é imprescindível para a ocorrência da acantólise (ESPAÑA et al., 1997), não está excluída a possibilidade de este sistema contribuir nas lesões do PFE. Existem indicações de que a ativação do complemento pode intensificar os efeitos dos auto-anticorpos patogênicos do pênfigo foliáceo. Foi demonstrado que a adição de fonte de complemento intensifica o processo acantolítico, induzido pelas imunoglobulinas do pênfigo, em células epidérmicas cultivadas *in vitro* (KAWANA et al., 1985). Uma outra evidência provém da co-localização de moléculas de C3 e de IgG na superfície dos queratinócitos, das camadas epidérmicas superiores, das lesões do pênfigo foliáceo (HERNANDEZ et al., 1997). A relevância da IL-6 em doenças auto-imunes cuja patogênese mostra o envolvimento de C3, foi demonstrada na miocardite experimental induzida em camundongos (ERIKSSON et al., 2003). Segundo estes autores, os animais com deficiência de IL-6 mostraram-se resistentes ao desenvolvimento da auto-imunidade patogênica. Postulamos que um desequilíbrio na produção de IL-6, decorrente da presença do alelo alto produtor -174 G, promove o aumento da expressão de C3 e de outros mediadores da inflamação resultando em maior dano às células epidérmicas.

***IL-6 e diferenciação das células Th2:*** a interleucina 6, que é produzida por

macrófagos ou células dendríticas durante a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> precursores (Th0), contribui na diferenciação dessas células em linfócitos Th2 (DIEHL e RINCÓN, 2002). Estes constituem o tipo celular predominante nas lesões do PFE e condizem com o perfil dos clones auto-reativos T CD4<sup>+</sup> específicos para a dsg-1 que foram isolados de sangue periférico de pacientes com esta dermatose. O controle exercido pela IL-6 na polarização das células Th é efetuado por meio de mecanismos diferentes que utilizam duas vias independentes de sinalização (DIEHL e RINCÓN, 2002). A IL-6 ativa o fator de transcrição NFAT, que, por sua vez, induz a produção endógena de IL-4 e conseqüentemente a diferenciação em Th2. Por outro lado, a IL-6 interfere com a produção do IFN $\gamma$  por meio da indução do SOCS1 (*Suppressor Of Cytokine Signaling*), que é um regulador negativo de sua sinalização, com conseqüente inibição da diferenciação das células Th0 em Th1. Sugerimos que a produção mais elevada de IL-6, devido à presença da variante -174 G, pode favorecer a diferenciação dos clones Th0 específicos para a dsg-1 em Th2 e a manutenção destes clones devido às suas propriedades anti-apoptóticas. Estes, por sua vez, podem tanto contribuir na produção de auto-anticorpos patogênicos, via cooperação com os clones auto-reativos de linfócitos B, quanto na produção de citocinas tipo 2 que vão atuar na manutenção e exacerbação da resposta auto-imune.

***IL-6 e diferenciação das células B em células plasmáticas:*** a IL-6 atua na diferenciação de linfócitos B em células plasmáticas, na manutenção destas células, bem como no desvio de classe de imunoglobulinas. Com base nestas propriedades da IL-6, sugerimos que níveis elevados desta interleucina podem favorecer e sustentar o ramo humoral da imunidade patogênica do PFE. O aumento na sua produção pode contribuir na diferenciação e manutenção dos clones auto-reativos específicos para a dsg-1 e influir na produção dos anticorpos patogênicos, em sua maioria da subclasse IgG4. Entretanto, LI et al. (2003), sugerem que a patogenicidade do auto-anticorpo não está associada à subclasse de imunoglobulina e sim à sua especificidade.

O envolvimento da IL-6 na produção de auto-anticorpos tem sido demonstrado em várias doenças humanas, bem como em seus modelos animais correspondentes (ISHIHARA e HIRANO, 2002). Segundo RIECKMANN et al. (1997), vários estudos mostram a influência da IL-6 no processo de diferenciação de células B em doenças auto-imunes como o lupus eritematoso sistêmico (LES) e a doença de Castleman. Níveis elevados desta citocina foram observados em ambas as doenças, e os efeitos da produção

exacerbada da IL-6 na fisiopatologia tanto do LES quanto da doença de Castleman foram demonstrados em modelos animais (RIECKMANN et al., 1997; ISHIHARA e HIRANO, 2002).

*IL-6 e espalhamento de epítomos*: as citocinas pró-inflamatórias presentes nas lesões auto-imunes podem modificar o mecanismo de processamento de antígenos pelas células apresentadoras, e conseqüentemente possibilitar a apresentação de antígenos crípticos às células T (LANZAVECCHIA, 1995).

Apesar de a IL-1, o TNF $\alpha$  e a IL-6 serem produzidos simultaneamente nos locais de inflamação, eles atuam de modo diferente no processo de ativação e maturação das células dendríticas. DRAKESMITH et al. (1998) demonstraram que a IL-6 pode levar à acidificação dos endossomas periféricos, e deste modo favorecer o processamento de novos epítomos do antígeno endocitado pelas células apresentadoras. Segundo estes autores, o pH mais ácido nos endossomas proximais à membrana citoplasmática possibilita que os peptídeos oriundos do processamento alterado pela IL-6 se liguem às moléculas de classe II, ficando protegidos da degradação quando transportados às vesículas lisossomais. Esta capacidade da IL-6 de modificar qualitativamente o processamento de antígenos pelas células dendríticas pode resultar na sensibilização de células T auto-reativas que reconhecem epítomos crípticos de antígenos próprios.

Postulamos que um desequilíbrio na produção de IL-6, predisposto pela presença do alelo -174 G, possa influenciar no fenômeno de espalhamento de epítomos sugerido por LI et al. (2003). Estes autores demonstraram que a auto-imunidade no PFE evolui de uma resposta humoral não patogênica contra o quinto domínio externo (EC5) da dsg-1, no período pré-clínico, a uma resposta patogênica conferida pelos auto-anticorpos contra o primeiro (EC1) e o segundo domínios (EC2) da dsg-1. O aparecimento desses auto-anticorpos, cuja patogenicidade foi comprovada por experimentos de transferência passiva em camundongos, coincide com a fase de manifestação dos sintomas do PFE. Níveis elevados de IL-6 podem facilitar a apresentação de novos peptídeos, procedentes dos dois primeiros ectodomínios da desmogleína 1, às células T. Estes clones auto-reativos irão interagir com os clones de linfócitos B responsáveis pela produção dos auto-anticorpos patogênicos anti-EC1 e anti-EC2.

## 5.6 MODELO DE PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

Um modelo de duas fases é proposto por LI et al. (2003) para explicar a imunopatogênese do PFE. Numa primeira fase, a resposta humoral constituída de anticorpos contra o quinto domínio da *dsg-1* (EC5) é desencadeada por um antígeno ambiental, possivelmente transmitido pelo vetor *Simulium nigrimanum*, antígeno este que apresenta identidade de seqüência com a *dsg-1*. Eles justificam que a ausência de patogenicidade dos anticorpos contra o EC5, que foi comprovada pela transferência passiva em camundongos, se deve à localização críptica deste ectodomínio que impede a ligação destes auto-anticorpos. Segundo estes autores, somente indivíduos geneticamente suscetíveis entram na segunda fase, na qual ocorre o espalhamento de epítomos com produção dos auto-anticorpos patogênicos contra EC1 e EC2. Eles postulam que os alelos HLA associados ao PFE constituem fatores genéticos que contribuem no espalhamento de epítomos, baseados na observação de que estes alelos de suscetibilidade não são freqüentemente encontrados em indivíduos normais que possuem anticorpos anti-EC5.

Concordamos com o modelo de LI et al. (2003) e também consideramos que as variantes dos genes HLA de classe II associadas positivamente ao PFE (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989; MORAES et al., 1991; CERNA et al., 1993; MORAES et al., 1997; PAVONI et al., 2003; ROXO, 2003) são capazes de apresentar peptídeos da *dsg-1* às células T, cujos receptores são específicos para epítomos de EC1 e EC2 que, por sua vez, irão colaborar com os clones B produtores dos auto-anticorpos patogênicos.

Baseando-nos nos resultados do presente estudo, levantamos a hipótese de que a *IL6* -174 G também constitui um alelo de suscetibilidade que pode influenciar no espalhamento de epítomos, além de contribuir na exacerbação das lesões epidérmicas pela indução de mediadores inflamatórios como o terceiro componente do complemento, e de favorecer a diferenciação dos clones T e B auto-reativos e a sustentação da auto-imunidade patogênica do PFE.

Apesar de os resultados deste e de outros estudos sugerirem a influência de fatores genéticos na imunopatogênese do PFE, foi observado por LI et al. (2003) que o tempo de incubação entre a primeira e a segunda fase da doença pode se estender por vários anos. Este fato é intrigante, uma vez que os genótipos dos indivíduos estão prestabelecidos e os alelos de suscetibilidade já estão presentes. A possível influência da IL-6 na patogênese do PFE nos permite especular que o tempo de incubação variável possa ser dependente de

estímulos exógenos subsequentes que desencadeiem processos inflamatórios. Estes estímulos podem ser decorrentes de novas exposições ao mesmo fator ou a outros fatores ambientais que promovam inflamação acompanhada de desequilíbrio na produção de interleucina 6.

A presença de moléculas de IL-6 e de seus transcritos nas lesões do PFE, demonstrada em estudos anteriores, e a associação positiva com a variante -174 G observada no presente estudo sugerem, mas não comprovam, o efeito direto da IL-6 na fisiopatologia desta dermatose. Esta associação deve ser corroborada em outros estudos da mesma ou de diferentes etnias, e mesmo assim não podemos afirmar que o alelo G esteja diretamente envolvido, pois não podemos excluir a possibilidade de ele estar em desequilíbrio de ligação com uma variante de um verdadeiro gene de suscetibilidade.

A investigação da patogenicidade da IL-6 pode ser realizada por meio de diferentes estratégias experimentais. Os seus efeitos podem ser analisados em células cultivadas *in vitro* ou em modelos animais, mediante o bloqueio de suas atividades por meio de anticorpos específicos. A sua relevância na patogênese do PFE também pode ser avaliada pela indução do aumento de sua expressão utilizando animais transgênicos para o gene *IL6*, ou pela sua deficiência em animais com o gene *IL6* nocauteado. Somente após a comprovação de seu efeito patogênico direto no PFE é que pode ser considerado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem ao bloqueio desta citocina para futura experimentação em ensaios clínicos humanos.

## 5.7 MICROSSATÉLITES DO CPH E PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

Este estudo revelou associações entre o PFE e variantes do loco microsatélite *G51152*, que é um marcador de localização centromérica ao loco *HLA-DQB1*, sendo de 25 a 30 Kb a distância aproximada entre estes locos. Associações negativas foram encontradas, na amostra total, com os alelos *G51152\*215*, *\*217* e *\*223*. A análise das subamostras caucasóide e negróide mostrou as mesmas tendências de associações negativas observadas na amostra total, embora as diferenças não sejam estatisticamente significantes; exceto a associação entre o alelo *\*215* e PFE que se mantém significativa nos caucasóides. Uma associação positiva foi encontrada com o alelo *\*227*, cuja frequência mostrou-se significativamente maior nos pacientes tanto na amostra total quanto nos caucasóides e nos negróides.

A análise de haplótipos dos genes *HLA* de classe II e do microssatélite *G51152* mostrou associação positiva com *DRB1\*0102\_DQA1\*0101\_DQB1\*0501\_G51152\*227* (OR = 8,09) e negativa com *DRB1\*0701\_DQA1\*0201\_DQB1\*02\_G51152\*215* (OR = 0,06) e *DRB1\*1101\_DQA1\*0501\_DQB1\*0301\_G51152\*215* (OR = 0,05). Observamos que o alelo *G51152\*227* é um marcador de suscetibilidade porque está presente nos haplótipos constituídos de variantes *HLA* associadas com predisposição ao PFE. Já, o alelo *G51152\*215* é um marcador de proteção ao PFE porque se encontra nos mesmos haplótipos que os alelos *HLA* associados com resistência a esta doença.

Tais resultados confirmam as associações do PFE com alelos das sub-regiões *DR* e *DQ* reveladas em estudos prévios (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989; PAVONI et al., 2001; ROXO, 2003). A magnitude das associações com as variantes do loco *G51152* sugere que *DQ* possa estar primariamente envolvido na patogênese do PFE. Entretanto, esta hipótese necessita confirmação por meio da análise de outros marcadores localizados na extensão do CPH entre *HLA-DQB1* e *DRA*.

Nenhuma associação foi observada com as variantes dos microssatélites *D6S265*, *D6S273*, *D6S276*, *D6S291*, *MIB*, *MOGCA*, *RING3CA* e *TAPICA*. Esta ausência de associações nos permite concluir que os genes localizados próximos a estes oito microssatélites não exercem influência, ou têm um efeito reduzido, na patogênese do pênfigo foliáceo endêmico. Um número maior de marcadores microssatélites será empregado para ampliar a investigação de genes de suscetibilidade ao PFE localizados no Complexo Principal de Histocompatibilidade.

## 6 CONCLUSÕES

- As novas mutações de ponto identificadas nas posições **-1491 (T → A)**, **-1391 (C → T)**, **-1226 (T → C)** e em **-1380 (G → C)** do gene *TNF* não constituem marcadores genéticos úteis, devido às suas baixas frequências. Por esta razão, não foram investigadas para possíveis associações com o PFE.
- Não encontramos associações entre as variantes de *IL1A* **-889**, *IL1B* **-511**, *IL1B* **+3954**, *IL1RN* nt **9261** e o PFE e, tampouco, com os haplótipos constituídos por esses polimorfismos. Sugerimos que estas variantes dos genes do complexo da *IL1* não constituem fatores de proteção ou suscetibilidade ao PFE, nessa população.
- Não evidenciamos associações entre as variantes de *IL10* **-1082** e **-592** e o PFE na amostra total, nem nas subamostras caucasóide e negróide. Sugerimos que estas variantes não constituem, individualmente, fatores de risco ou proteção ao PFE. Nos negróides, observamos uma associação negativa fraca com o haplótipo **-1082 G\_-592 C** (OR = 0,49). O significado desta associação deve ser esclarecido em amostras de maior tamanho, em negróides e em outras etnias.
- Verificamos, na amostra total, uma associação positiva fraca (OR = 2,71) entre o genótipo T/T do polimorfismo *IL4* **-590** e o PFE. Tendência de associação semelhante foi observada nos caucasóides (OR = 1,55) e nos negróides (OR = 3,19). Identificamos uma associação negativa fraca com a variante C na amostra total (OR = 0,37), e observamos a mesma tendência nos negróides (OR = 0,31) e nos caucasóides (OR = 0,65). As frequências do genótipo C/C foram inferiores nos pacientes quando comparadas às dos controles da amostra total e dos caucasóides, mas as diferenças não têm significância estatística. Sugerimos um estudo adicional em amostras de tamanho maior para elucidar o significado destas associações nas diferentes etnias da população brasileira.

- A análise das variantes alélicas do nucleotídeo 148 do gene *IL4R* não revelou associações significantes com o pênfigo foliáceo endêmico. Estas variantes possivelmente não conferem suscetibilidade ou proteção ao PFE, nesta amostra da população brasileira.
- Com respeito ao polimorfismo -174 do gene *IL6*, constatamos uma associação negativa entre o genótipo C/C e o PFE na amostra total (OR = 0,13), sendo a mesma tendência observada nos caucasóides (OR = 0,18) e nos negróides (OR = 0,18), embora as diferenças não sejam significantes nestas subamostras. Encontramos uma associação positiva com a variante -174 G na amostra total (OR=7,66), e a mesma tendência de associação, sem significância estatística, nos caucasóides (OR=5,63) e nos negróides (OR=5,25). Sugerimos que o genótipo C/C exerce um efeito protetor, enquanto o alelo G confere suscetibilidade ao PFE. Postulamos que a produção aumentada de IL-6, que é predisposta pela variante G, contribui à patogênese do PFE pela indução de mediadores inflamatórios, da diferenciação e sustentação dos clones Th2 e clones B específicos para a dsg-1, e pela ação sobre as células dendríticas favorecendo, deste modo, o fenômeno de espalhamento de epítomos que resulta na produção dos anticorpos patogênicos anti-EC1 e anti-EC2.
- A ausência de associação entre as variantes dos microssatélites *D6S265*, *D6S273*, *D6S276*, *D6S291*, *MIB*, *MOGCA*, *RING3CA* e *TAP1CA* e o PFE sugere que as variantes alélicas dos genes do CPH, intimamente ligados a estes marcadores, não influenciem na suscetibilidade ao PFE. Quanto ao *G51152*, associações negativas foram encontradas com as variantes 215 (OR = 0,34), 217 (OR = 0,27) e 223 (OR = 0,39). A associação positiva entre a variante 227 e o PFE na amostra total (OR = 6,00), também foi observada nos caucasóides (OR = 5,73) e nos negróides (OR = 4,60). Estes resultados estão em conformidade com as associações do PFE com variantes das sub-regiões DR e DQ identificadas em estudos anteriores.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v.383, p.787-793, 1996.
- AGARWAL, S.; RAO, A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. **Immunity**, v.9, p.765-775, 1998a.
- AGARWAL, S.; RAO, A. Long-range transcriptional regulation of cytokine gene expression. **Curr Biol**, v.10, p.345-352, 1998b.
- AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.9, p.745-756, 2003.
- AHMED, A.R.; SAMI, N. Intravenous immunoglobulin therapy for patients with pemphigus foliaceus unresponsive to therapy. **J Am Acad Dermatol**, v.46, n.1, p.42-49, 2002.
- ALTARESCU, G.; PHILLIPS, M.; FOLDES, A.J.; ELSTEIN, D.; ZIMRAN, A.; MATES, M. The interleukin-6 promoter polymorphism in Gaucher disease: a new modifier gene? **QJM**, v.96, n.8, p.575-578, 2003.
- ALVARADO-FLORES, E.; AVALOS-DIAZ, E.; DIAZ, L.A.; HERRERA-ESPARZA, R. Anti-idiotypic antibodies neutralize in vivo the blistering effect of Pemphigus foliaceus IgG. **Scand J Immunol**, v.53, n.3, p.254-258, 2001.
- 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. **J Clin Invest**, v.90, n.3, p.919-926, 1992.
- AMAGAI, M.; KOCH, P.J.; NISHIKAWA, T.; STANLEY, J.R. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. **J Invest Dermatol**, v.106, p.351-355, 1996.
- AMAGAI, M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. **J Dermatol Sci**, v.20, p.92-102, 1999.
- AMAGAI, M.; TSUNODA, K.; ZILLIKENS, D.; NAGAI, T.; NISHIKAWA, T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. **J Am Acad Dermatol**, v.40, p.167-170, 1999.
- AMAGAI, M.; TSUNODA, K.; SUSUKI, H.; NISHIFUJI, K.; KOYASU, S.; NISHIKAWA, T. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. **J Clin Invest**, v.105, p.625-631, 2000.

AMEGLIO, F.; D'AURIA, L.; CORDIALI-FEI, P.; TRENTO, E.; D'AGOSTO, G.; MASTROIANNI, A.; GIANNETTI, A.; GIACALONE, B. Anti-intercellular substance antibody log titres are correlated with serum concentrations of interleukin-6, interleukin-15 and tumor necrosis factor-alpha in patients with Pemphigus vulgaris relationships with peripheral blood neutrophil counts, disease severity and duration and patient's age. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.13, n.4, p.220-224, 1999.

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

AOYAMA, Y.; OWADA, M.K.; KITAJIMA, Y. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. **Int J Immunol**, v.29, p.2233-2240, 1999.

ARAI, N.; NOMURA, D.; VILLARET, D.; DEWAAL-MALEFIJT, R.; SEIKI, M.; YOSHIDA, M.; MINOSHIMA, S.; FUKUYAMA, R.; MAEKAWA, M.; KUDOH, J.; SHIMIZU, N.; YOKOTA, K.; ABE, E.; YOKOTA, T.; TAKEBE, Y.; ARAI, K. Complete nucleotide sequence of the chromosome gene for human IL-4 and its expression. **J Immunol**, v.142, p.274-282, 1989.

AREND, W.P.; GUTHRIDGE, C.J. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. **Ann Rheum Dis**, v.59, suppl.1, p.I60-I64, 2000.

ARNEMANN, J. SPURR, N.K.; WHEELER, G.N.; PARKER, A.E.; BUXTON, R.S. Chromosomal assignment of the human genes coding for the major proteins of the desmosome junction, desmoglein DGI (DSG), desmocollins DGII/III (DSC), desmoplakins DPI/II (DSP) and plakoglobin DPIII (JUP). **Genomics**, v.10, p.640-645, 1991.

ARNEMANN, J. SPURR, N.K.; BUXTON, R.S. The human gene (DSG3) coding for the pemphigus vulgaris antigen is, like the genes coding for the other two known desmogleins, assigned to chromosome 18. **Hum Genet**, v.89, p.347-350, 1992.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H.D. Interleukin-10 Therapy - Review of a new approach. **Pharmacol Rev**, v.55, p.241-269, 2003.

ASMY, I.; HAJEER, A.; OLLIER, W.E.R.; WILSON, A.G. Association between an intronic TNFA polymorphism (+691) and TNF locus microsatellites. **Ann Rheum Dis**, v.58, suppl., p.41, 1999.

AUAD, A. Pênfigo foliáceo sul-americano no estado de Goiás. **Rev Pat Trop**, v.1, p.293-346, 1972.

BAILLY, S.; DI GIOVINE, F.S.; DUFF, G.W. Polymorphic tandem repeat region in interleukin-1 alpha intron 6. **Hum Genet**, v.91, p.85-86, 1993.

BECK, S.; TROWSDALE, J. The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v.1, p.117-137, 2000.

BEEBE, A.M.; CUA, D.J.; DE WAAL MALEFYT, R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). **Cytokine Growth Factor Rev**, v.13, p.403-412, 2002.

BENNETT, S.T.; LUCASSEN, A.M.; GOUGH, S.C.L.; POWELL, E.E.; UNDLIEN, D.E.; PRITCHARD, L.E.; MERRIMAN, M.E.; KAWAGUCHI, Y.; DRONSFIELD, M.J.; POCIOT, F. ET AL. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. **Nat Genet**, v.9, p.284-292, 1995.

BEUTLER, B.; GRAU, G.E. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. **Crit Care Med**, v.21, n.10, supl., p.S423-S435, 1993.

BEUTNER, E.H.; PRIGENZI, L.S.; HALE, W.; LEME, C.A.; BIER, O.G.. Immunofluorescent studies of autoantibodies to intercellular areas of epithelia in Brazilian pemphigus foliaceus. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.127, p.81-86, 1968.

BHOL, K.; NATARAJAN, K.; NAGARWALLA, N.; MOHIMEN, A.; AOKI, V. AND AHMED, A.R. Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris. A model for autoimmunity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.92, p.5239-5243, 1995.

BHOL, K.; ROJAS, A.; KHAN, I.U.; AHMED, A.R. Presence of interleukin-10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid. **Cytokine**, v.12, p.1076-1083, 2000.

BIDWELL, J.L.; WOOD, N.A.P.; MORSE, H.R.; OLOMOLAIYE, O.O.; LAUNDY, G.J. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments. **Eur J Immunogenet**, v.25, p.83-266, 1998.

BIDWELL, J.; KEEN, L.; GALLAGER, G.; KIMBERLY, R.; HUIZINGA, T.; MCDERMOTT, M.F.; OKSENBERG, J.; MCNICHOLL, J.; POCIOT, F.; HARDT, C.; D'ALFONSO, S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes Immun**, v.1, p.3-9, 1999a.

BIDWELL, J.L.; WOOD, N.A.P.; MORSE, H.R.; OLOMOLAIYE, O.O.; LAUNDY, G.J. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments. **Eur J Immunogenet**, v.26, p.135-223, 1999b.

BIDWELL, J.; KEEN, L.; KIMBERLY, R.; HUIZINGA, T.; MCDERMOTT, M.F.; OKSENBERG, J.; MCNICHOLL, J.; POCIOT, F.; HARDT, C.; D'ALFONSO, S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 1. **Genes Immun**, v.2, p.61-70, 2001.

BIGNON, J.D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. Protocols of the 12<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In: CHARRON, D. (Ed.) **Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications**. Paris: EDK Medical and Scientific International Publisher, 1997. v.1; p.584-595.

BLAKEMORE, A.; TARLOW, J.K.; CORK, M.J.; GORDON, C.; EMERY, P.; DUFF, G.W. Interleukin-1 receptor antagonist genepolymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.37, p.1380-1385, 1994.

BLANKESTEIN, T.; VOLK, H.D.; TECHERT-JENDRUSCH, C.; QIN, Z.; RICHTER, G.; DIAMANTSTEIN, T. Lack of correlation between Bgl II RFLP in the human interleukin 6 gene and rheumatoid arthritis. **Nucleic Acids Res**, v.17, n.21, p.8902, 1989.

BOOTHBY, M.; MORA, A.L.; ARONICA, M.A.; YOUN, J.; SHELLER, J.R.; GOENKA, S.; STEPHENSON, L. IL-4 signaling, gene transcription regulation, and the control effector T cells. **Immunol Res**, v.23, p.179-191, 2001.

BORISH, L.; MASCALI, J.J.; KLINNERT, M.; LEPPERT, M.; ROSENWASSER, L.J. SSC polymorphisms in interleukin genes. **Hum Mol Genet**, v.3, p.1710, 1994.

BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v.111, n.2, p.460-475, 2003.

BOULANGER, M.J.; CHOW, D.C.; BREVNOVA, E.E.; GARCIA, K.C. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130. **Science**, v.300, p.2101-2104, 2003.

BOWCOCK, A.M.; RAY, A.; ERLICH, H.; SEHGAL, P. Rapid detection and sequencing of alleles in the 3' flanking region of the interleukin-6 gene. **Nucleic Acids Res**, v.17, n.17, p.6855-6864, 1989.

BRINKMAN, B.M.; HUIZINGA, T.W.; KURNAB, S.S.; VAN DER VELDE, E.A.; SCHREUDER, G.M.; HAZES, J.M.; BREEDVELD, F.C.; VERWIJ, C.L. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? **Br J Rheumatol**, v.36, p.516-521, 1997.

BUCHS, N.; SILVESTRI, T.; DI GIOVINE, F.S.; CHABAUD, M.; VANNIER, E.; DUFF, G.W.; MIOSSEC, P. IL-4 VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection against destruction. **Rheumatology**, v.39, n.10, p.1126-1131, 2000.

BUCHS, N.; DI GIOVINE, F. S.; SILVESTRI, T.; VANNIER, E.; DUFF, G. W.; MIOSSEC, P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. **Genes Immun**, v.2, n.4, p.222-228, 2001.

BURCHARD EG, SILVERMAN EK, ROSENWASSER LJ, BORISH L, YANDAVA C, PILLARI A, WEISS ST, HASDAY J, LILLY CM, FORD JG, DRAZEN JM. Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v.160, n.3, p.919-922, 1999.

CAGGANA, M.; WALKER, K.; REILLY, A.A.; CONROY, J.M.; DUVA, S.; WALSH, A.C. Population-based studies reveal differences in the allelic frequencies of two functionally significant human interleukin-4 receptor polymorphisms in several ethnic groups. **Genet Med**, v.1, n.6, p.267-271, 1999.

CAMPBELL, I.; REIS, V.; AOKI, V.; CUNHA, P.; HANS-FILHO, G.; ALVES, G.; ROCHA, R.; FRIEDMAN, H. Pênfigo foliáceo endêmico/fogo selvagem. **An Bras Dermatol**, v.76, p.13-33, 2001.

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

CARSLWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumours. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.72, p.3666-3670, 1975.

CASPI, R.R. The role of cytokines in induction and regulation of autoimmune uveitis. In: KUCHROO, V.K.; SARVETNIK, N.; HAFLER, D.A.; NICHOLSON, L. B. (Ed.). **Cytokines and Autoimmune Diseases**. Totowa: Humana Press, 2002. p.227-245.

CAVAILLON, J.M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. **Cell Mol Biol**, v.47, n.4, p.695-702, 2001.

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

CHIOSSI, M.P.; ROSELINO, A.M. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): a series from the Northeastern region of the state of São Paulo, Brazil, 1973-1998. **Rev Inst Med Trop**, v.43, p.59-62, 2001.

CHRISTADOSS, P.; GOLUSZKO, E. Myasthenia Gravis. In: KUCHROO, V.K.; SARVETNIK, N.; HAFLER, D.A.; NICHOLSON, L. B. (Ed.). **Cytokines and Autoimmune Diseases**. Totowa: Humana Press, 2002. p.373-385.

COLLADO-ESCOBAR, M.D.; NIETO, A.; MATARAN, L.; RAYA, E.; MARTIN, J. Interleukin 6 gene promoter polymorphism is not associated with ankylosing spondylitis. **J Rheumatol**, v.27, n.6, p.1461-1463, 2000.

COX, E.D.; HOFFMANN, S.C.; DIMERCURIO, B.S.; WESLEY, R.A.; HARLAN, D.M.; KIRK, A.D.; BLAIR, P.J. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. **Transplantation**, v.72, n.4, p.720-726, 2001.

CRAWLEY, E.; KAY, R.; SILLIBOURNE, J.; PATEL, P.; HUTCHINSON, I.; WOO, P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v.42, p.1101-1108, 1999.

CULLEN, M.; MALASKY, M.; HARDING, A.; CARRINGTON, M. High-density map of short tandem repeats across the human major histocompatibility complex. **Immunogenetics**, v.54, n.12, p.900-910, 2003.

D'ALFONSO, S.; RICHIARDI, P.M. An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) chain-encoding gene. **Immunogenetics**, v.44, p.321-322, 1996.

D'ALFONSO, S.; RAMPI, M.; ROLANDO, V.; GIORDANO, M.; MOMIGLIANO-RICHIARDI, P. New polymorphisms in the IL-10 promoter region. **Genes Immun**, v.1, p.231-233, 2000.

DANIS, V.A.; MILLINGTON, M.; HYLAND, V.J.; GRENNAN, D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. **Clin Exp Immunol**, v.99, p.303-310, 1995.

D'AURIA, L.; BONIFATI, C.; MUSSI, A.; D'AGOSTO, G.; DE SIMONE, C.; GIACOLONE, B.; FERRARO, C.; AMEGLIO, F. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity. **Eur Cytokine Netw**, v.8, p.383-87, 1997.

D'AURIA, L.; MUSSI, A.; BONIFATI, C.; MASTROIANNI, A.; GIACALONE, B.; AMEGLIO, F. Increased serum IL-6, TNF-alpha and IL-10 levels in patients with bullous pemphigoid: relationships with disease activity. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.12, n.1, p.11-15, 1999.

DE BENEDETTI, F.; MASSA, M.; ROBBIONI, P.; RAVELLI, A.; BURGIO, G.R.; MARTINI, A. Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v.34, p.1158-1163, 1991.

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

DE MESSIAS, I.T.; SANTAMARIA, J.; RAGIOTTO, R.; DOI, E.M.; KAJDACSZY-BALLA, A. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. **Clin Exp Dermatol**, v.14, n.1, p.51-55, 1989.

DEICHMANN, K.; BARDUTZKY, J.; FORSTER, J.; HEINZMANN, A.; KUEHR, J. Common polymorphisms in the coding part of the IL-4-receptor gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v.231, p.696-697, 1997.

DERKX, H.H.F.; BRUIN, C.V.; JONGENEEL, L.P.; DE WAAL, L.P.; BRINKMAN, B.M.N.; VERWEIJ, C.L.; HOUWING-DUISTERMAAT, J.J.; ROSENDAL, F.R.; VAN DEVENTER, S.H.J. Familial differences in endotoxin-induced TNF release in whole blood mononuclear cells in vitro: relationship to TNF gene polymorphism. **J Endotoxin Res**, v.2, p.19-25, 1995.

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

- DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Mol Immunol**, v.39, p.531-636, 2002.
- DI GIOVINE, F.S.; TAKHSH, E.; BLAKEMORE, A.I.F.; DUFF, G.W. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 $\beta$  gene (IL1 $\beta$ ). **Hum Mol Genet**, v.1, n.6, p.450, 1992.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism. **Blood**, v.77, n.8, p.1627-1652, 1991.
- DINARELLO, C.A. Biologic Basis of Interleukin-1 in Disease. **Blood**, v.87, n.6, p.2095-2147, 1996.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 antagonist. **Int Rev Immunol**, v.16, p.457-499, 1998.
- DINARELLO, C.A. Setting the cytokine trap for autoimmunity. **Nat Med**, v.9, n.1, p.20-22, 2003.
- DONGER, C.; GEORGES, J.L.; NICAUD, V.; MORRISON, C.; EVANS, A.; KEE, F.; ARVEILER, D.; TIRET, L.; CAMBIEN, F. New polymorphisms in the interleukin-10 gene: relationships to myocardial infarction. **Eur J Clin Invest**, v.31, n.1, p.9-14, 2001.
- DRAKESMITH, H.; O'NEIL, D.; SCHNEIDER, S.C.; BINKS, M.; MEDD, P.; SERCARZ, E.; BEVERLEY, P.; CHAIN, B. In vivo priming of T cells against cryptic determinants by dendritic cells exposed to IL6 and native antigen. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.14903-14908, 1998.
- EATON, D.P.; DIAZ, L.A.; HANS-FILHO, G.; SANTOS, V.D.; AOKI, V.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E.A.; SAMPAIO, S.A.; GOTTLIEB, M.S.; GIUDICE, G.J.; LOPEZ, A.; CUPP, E.W. Comparison of black fly species (Diptera Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease free sites in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **J Med Entomol**, v.35, p.120-131, 1998.
- EMPINOTTI, J.C.; DIAZ, L.A.; MARTINS, C.R.; RIVITTI, E.A.; SAMPAIO, S.A.; LOMBARDI, C.; SANCHES, J.A. Endemic pemphigus foliaceus in western Parana, Brazil (1976-1988). Cooperative Group for Fogo Selvagem Research. **Br J Dermatol**, v.123, n.4, p.431-437, 1990.
- EPPLEN, C.; FRANK, G.; GOMOLKA, M.; ALBERT, E.; NURNBERG, P.; EPPLEN, J.T. Dinucleotide repeat polymorphism in the human IL1A gene. **Hum Mol Genet**, v.3, p.1710, 1994.
- ERIKSSON, U.; KURRER, M.O.; SCHMITZ, N.; MARSCH, S.C.; FONTANA, A.; EUGSTER, H.P.; KOPF, M. Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement C3. **Circulation**, v.107, p.320-325, 2003.
- ESKDALE, J.; GALLAGHER, G. A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. **Immunogenetics**, v.42, p.444-445, 1995.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; GALLAGHER, G. A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL10 gene. **Immunogenetics**, v.45, p.82-83, 1996.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; TESCH, H.; GALLAGHER, G. Mapping of the human gene and further characterization of the 5' flanking sequences. **Immunogenetics**, v.46, p.120-128, 1997.

ESKDALE, J.; GALLAGHER, G.; VERWEIJ, C.L.; KEIJERS, V.; WESTENDORP, R.G.; HUIZINGA, T.W. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.9465-9470, 1998.

ESPAÑA, A.; DIAZ, L.A.; MASCARO JR., J.M.; GIUDICE, G.J.; FAIRLEY, J.A.; TILL, G.O.; LIU, Z. Mechanisms of acantholysis in pemphigus foliaceus. **Clin Immunol Immunopathol**, v.85, p.83-89, 1997.

EYRE, R.W.; STANLEY, J.R. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. **J Clin Invest**, v.81, p.807-812, 1988.

FEDETZ, M.; MATESANZ, F.; PASCUAL, M.; MARTIN, J.; FERNANDEZ, O.; GUERRERO, M.; ALCINA, A. The -174/-597 promoter polymorphisms in the interleukin-6 gene are not associated with susceptibility to multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, v.190, p.69-72, 2001.

FELICIANI, C.; TOTO, P.; AMERIO, P.A.; AMERIO, P. In vitro C3 mRNA expression in pemphigus vulgaris: complement activation is increased by IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ . **J Cutan Med Sur**, v.3, p.140, 1999.

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

FERGUSON-SMITH, A.C.; CHEN, Y.F.; NEWMAN, M.S.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B.; RUDDLE, F.H. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyt stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. **Genomics**, v.2, n.3, p.203-208, 1988.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v.170, p.2081-2095, 1989.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUALKIN, J.S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of a novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, v. 102, p.1369-1376, 1998.

FOISSAC, A.; CAMBON-THOMSEN A. Microsatellites in the HLA region: 1998 update. **Tissue Antigens**, v.52, n.4, p.318-352, 1998.

FOISSAC, A.; SALHI, M.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens*, v.55, p.477-509, 2000.

FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; ROCHA-ALVAREZ, R.; FERRARI, I.; COIMBRA, C.E.A.; MORAES, J.R.; FLOWERS, N.M.; STASTNEY, P.; FERNANDEZ-VINA, M.; OLAGUE-ALCALA, M.; DIAZ, L.A. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in native Americans from Brazil. *J Am Acad Dermatol*, v.32, p.949-956, 1995.

FUGGER, L.; MORLING, N.; BENDTZEN, K.; RYDER, L.; ODUM, N.; GEORGSSEN, J.; SVEJGAARD, A. Msp I polymorphism in the human interleukin e (IL6) gene. *Nucleic Acids Res*, v.17, n.11, p.4419, 1989a.

FUGGER, L.; MORLING, N.; BENDTZEN, K.; RYDER, L.; ANDERSEN, V.; HEILMAN, F.; PEDERSEN, K.; FRIIS, J.; HALBERT, P.; SVEJGAARD, A. IL-6 gene polymorphism in rheumatoid arthritis, pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and in healthy Danes. *J Immunogenet*, v.16, p.461-465, 1989b.

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

GASCAN, H.; GAUCHAT, J.F.; RONCAROLO, M.G.; YSSEL, H.; SPITS, H.; DE VRIES, J.E. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med*, v.173, p.747-750, 1991.

GENEVAY, S.; DI GIOVINE, F.S.; PERNEGER, T.V.; SILVESTRI, T.; STINGELIN, S.; DUFF, G.; GUERNE, P.A. Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v.47, n.3, p.303-309, 2002.

GIBSON, A.W.; EDBERG, J.C.; WU, J.; WESTENDORP, R.G.; HUIZINGA, T.W.; KIMBERLY, R.P. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, v.166, p.3915-3922, 2001.

GRANDO, S.A.; GLUKHENKY, B.T.; DRANNIK, G.N.; EPSHTEIN, E.V.; KOSTROMIN, A.P.; KOROSTASH, T.A. Mediators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*, v.125, n.7, p.925-930, 1989.

GROSS, V.; ANDUS, T.; CAESAR, I.; ROTH, M.; SCHOLMERICH, J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology*, v.102, p.514-519, 1992.

GROUX, H.; BIGLER, M.; DE VRIES, J.E.; RONCAROLO, M.G. Interleukin-10 induces a long-term antigen specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*, v.184, p.19-29, 1996.

GROVE, J.; DALY, A.K.; BASSENDINE, M.F.; DAY, C.P. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v.26, p.143-146, 1997.

GUASCH, J.F. BERTINA, R.M.; REITSMA, P.H. Five novel intragenic dimorphisms in the human interleukin-1 genes combine to high informativity. **Cytokine**, v.8, p.598-602, 1996.

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

GUILLAUDEUX, T.; JANER, M.; WONG, G.K.; SPIES, T.; GERAGHTY, D.E. The complete genomic sequence of 424,015 bp at the centromeric end of the HLA class I region: Gene content and polymorphism. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, n.16, p.9494-9499, 1998.

HACKSTEIN, H.; HECKER, M, KRUSE S, BOHNERT A, OBER C, DEICHMANN KA, BEIN G. A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. **Immunogenetics**, v.53, n.4, p.264-269, 2001.

HAJEER, A.H.; HUTCHINSON, I.V. TNF- $\alpha$  Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications. **Microsc Res Tech**, v.50, p.216-228, 2000.

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER (Ed.). New York: Oxford University Press. **Microsatellites Evolution and Applications**, 1999. p.1-9.

HANS-FILHO, G.; DOS SANTOS, V.; KATAYAMA, J.H.; AOKI, V.; RIVITTI, E.A.; SAMPAIO, S.A.; FRIEDMAN, H.; MORAES, J.R.; MORAES, M.E.; EATON, D.P.; LOPEZ, A.L.; HOFFMANN, R.G.; FAIRLEY, J.A.; GIUDICE, G.J.; DIAZ, L.A. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **J Invest Dermatol**, v.107, n.1, p.68-75, 1996.

HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E.; EATON, D.P.; LIN, M.S.; DIAZ, L.A. Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) – 1998. **Clin Dermatol**, v.17, p.225-235, 1999.

HAUKIM N, BIDWELL JL, SMITH AJ, KEEN LJ, GALLAGHER G, KIMBERLY R, HUIZINGA T, MCDERMOTT MF, OKSENBERG J, MCNICHOLL J, POCIOT F, HARDT C, D'ALFONSO S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. **Genes Immun**, v.3, n.6, p.313-330, 2002.

HEHLGANS, T.; MANNEL, D.N. The TNF-TNF receptor system. **Biol Chem**, v.383, n.10, p.1581-1585, 2002.

HELMINEN, M.; LAHDENPOHJA, N.; HURME, M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. **J Infect Dis**, v.180, n.2, p.496-500, 1999.

- HERNANDEZ, C.; AMAGAI, M.; CHAN, L.S. Pemphigus foliaceus: preferential binding of IgG1 and C3 at the upper epidermis. **Br J Dermatol**, v.136, p.249-252, 1997.
- HERSHEY, G.; FRIEDRICH, M.; ESSWEIN, L.; THOMAS, M.; CHATILA, T. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the  $\alpha$  subunit of the interleukin 4 receptor. **N Engl J Med**, v.337, p.1720-1725, 1997.
- HERTL, M.; KARR, R.W.; AMAGAI, M.; KATZ, S.I. Heterogeneous MHC II restriction pattern of auto-reactive desmoglein 3-specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. **J Invest Dermatol**, v.110, p.388-392, 1998.
- HEWARD, J.M.; NITHIYANANTHAN, R.; ALLAHABADIA, A.; GIBSON, S.; FRANKLYN, J.A.; GOUGH, S.C. No association of an interleukin 4 gene promoter polymorphism with Graves' disease in the United Kingdom. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.8, p.3861-3863, 2001.
- HIBI, M.; HIRANO, T. Signal transduction through cytokine receptors. **Int Rev Immunol**, v.17, p.75-102, 1998.
- HIGUCHI, T.; SEKI, N.; KAMIZONO, S.; YAMADA, A.; KIMURA, A.; KATO, H.; ITOH, K. Polymorphism of the 5' flanking region of the human tumor necrosis factor TNF-alpha gene in Japanese. **Tissue Antigens**, v.51, p.605-612, 1998.
- HIJAZI, Z.; HAIDER, M.Z. Interleukin-4 gene promoter polymorphism (C590T) and asthma in Kuwaiti Arabs. **Int Arch Allergy Immunol**, v.122, p.190-194, 2000.
- HIRSCH, R.; ANDERSON, J.; WEINBERG, J.M.; BURNSTEIN, P.; ECHT, A.; FERMIN, J.; HEILMAN, E.R.; LAUDE, T.A. Neonatal pemphigus foliaceus. **Am Acad Dermatol**, v.49, suppl. 2, S187-S189, 2003.
- HODGE, P.J.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.28 n.5, p.430-436, 2001.
- HOHJOH, H.; TOKUNAGA, K. Allele-specific binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor-alpha gene (TNFA) promoter. **Genes Immun**, v.2, p.105-109, 2001.
- HOWELL, W.M.; TURNER, S.J.; BATEMAN, A.C.; THEAKER, J.M. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. **Genes Immun**, v.2, p.25-31, 2001.
- HUANG, D.; PIRSKANEN, R.; HJELMSTRM, P.; LEFVERT, A.K. Polymorphisms in IL-1beta and IL-1 receptor antagonist genes are associated with myasthenia gravis. **J Neuroimmunol**, v.81, p.76-81, 1998.
- HUILGOL, S.C.; BLACK, M.M. Management of the immunobullous disorders. II. Pemphigus. **Clin Exp Dermatol**, v.20, p.283-293, 1995.

HUIZINGA, T.W.; WESTENDORP, R.G.; BOLLEN, E.L.; KEIJERS, V.; BRINKMAN, B.M. LANGERMANS, J.A.; BREEDVELD, F.C.; VERWEIJ, C.L.; VAN DE GAER, L.; DAMS, L.; CRUSIUS, J.B.; GARCIA-GONZALEZ, A.; VAN OOSTEN, B.W.; POLMAN, C.H.; PENA, A.S. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. **J Neuroimmunol**, v.72, p.149-153, 1997.

HULKKONEN, J.; PERTOVAARA, M.; ANTONEN, J.; PASTERNAK, A.; HURME, M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. **Rheumatology**, v.40, n.6, p.656-661, 2001.

HUNT, P.J.; MARSHALL, S.E.; WEETMAN, A.P.; BELL, J.I.; WASS, J.A.; WELSH, K.I. Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, n.5, p.1984-1988, 2000.

HURME, M.; HELMINEN, M. Polymorphism of the IL-1 gene complex in Epstein-Barr virus seronegative and seropositive adult blood donors. **Scand J Immunol**, v.48, n.3, p.219-222 1998.

IMANI F, RAGER KJ, CATIPOVIC B, MARSH DG. Interleukin-4 (IL-4) induces phosphatidylinositol 3-kinase (p85) dephosphorylation. Implications for the role of SHP-1 in the IL-4-induced signals in human B cells. **J Biol Chem**, v.272. n.12, p.7927-7931, 1997.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.13, p.357-368, 2002.

JAHROMI, M. M.; MILLWARD, B. A.; DEMAINE, A. G. A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. **J Interferon Cytokine Res**, v.20, n.10, p.885-888, 2000.

JEANNIN, J.; LECOANET, S.; DELNESTE, Y.; GAUCHAT, J.F.; BONNEFOY, J.Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **J Immunol**, v.160, p.3555-3561, 1998.

JIANG, H.; HARRIS, M.B.; ROTHMAN, P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. **J Allergy Clin Immunol**, v.105, p.1063-1070, 2000.

JONES, J.C.R.; ARNN, J.; STEHELIN, A.; GOLDMAN, R.D. Human autoantibodies against desmosomes: Possible causative factors in pemphigus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p.2781-2785, 1984.

JONES, C.C.; HAMILTON, R.G.; JORDON, R.E. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. **J Clin Immunol**, v.8, p.43-49, 1988.

JONGENEEL, C.V.; BRIANT, L.; UDALOVA, I.A.; SEVIN, A.; NEDOSPASOV, S.A.; CAMBON-THOMSEN, A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.9717-9721, 1991.

- JORDON, R.E. Complement activation in pemphigus. **J Invest Dermatol**, v.74, p.357-359, 1980.
- JUHASZ, I.; LAZARUS, G.S.; MURPHY, G.F.; SHIH, I.M.; HERLYN, M. Development of pemphigus vulgaris-like lesions in severe combined immunodeficiency disease in mice reconstituted with lymphocytes from patients. **J Clin Invest**, v.92, p.2401-2407, 1993.
- KALLEN, K.J. The role of trans-signaling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. **Biochim Biophys Acta**, v.1592, n.3, p.323-343, 2002.
- KAMIMURA, D.; ISHIIHARA, K.; HIRANO T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v.149, p.1-38, 2003.
- KANEMITSU, S. TAKABAYASHI, A.; SASAKI, Y.; KUROMARU, R.; IHARA, K.; KAKU, Y.; SAKAI, K.; HARA, T. Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.42, n.6, p.1298-1300, 1999.
- KANTARCI, O.H.; SCHAEFER-KLEIN, J.L.; HEBRINK, D.D.; ACHENBACH, S.J.; ATKINSON, E.J.; MCMURRAY, C.T.; WEINSHENKER, B.G. A population-based study of IL4 polymorphisms in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v.137, p.134-139, 2003.
- KASHI, Y.; SOLLER, M. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER (Ed.). New York: Oxford University Press. **Microsatellites Evolution and Applications**, 1999. p.10-23.
- KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as source of quantitative genetic variation. **Trends Genet**, v.13, p.74-78, 1997.
- KAWANA, S.; GEOGHEGAN, W.D.; JORDON, R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. II. Complement enhanced detachment of epidermal cells. **Clin Exp Immunol**, v.61, n.3, p.517-525, 1985.
- KAWANA, S.; GEOGHEGAN, W.D.; JORDON, R.E. Complement fixation by pemphigus antibody. III. Altered epidermal cell membrane integrity mediated by pemphigus antibody and complement. **J Invest Dermatol**, v.86, p.29-33, 1986.
- KAWANA, S.; DIAZ, L.A.; RIVITTI, E.A.; GEOGHEGAN, W.; JORDON, R.E. Complement fixation by Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies. **Clin Exp Immunol**, v.71, p.464-469, 1988.
- KAWASHIMA, T.; NOGUCHI, E.; ARINAMI, T.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; NAKAGAWA, H.; OTSUKA, F.; HAMAGUCHI, H. Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. **J Med Genet**, v.35, n.6, p.502-504, 1998.

KEIJSERS, V.; VERWEIJ, C.L.; WESTENDORP, R.G.J.; BREEDVELD, F.C.; HUIZINGA, T.W.J. IL10 polymorphisms in relation to production and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v.40, suppl., p.S179, 1997.

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

KENT, S.C.; VIGLIETTA, V.; HAFLER, D.A. Cytokines and human type 1 diabetes. In: KUCHROO, V.K.; SARVETNIK, N.; HAFLER, D.A.; NICHOLSON, L. B. (Ed.). **Cytokines and Autoimmune Diseases**. Totowa: Humana Press, 2002. p.295-316.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. NARAZAKI, M., TAGA, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood**, v.86, p.1243-1254, 1995.

KITANI, A.; CHUA, K.; NAKAMURA, K.; STROBER, W. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. **J Immunol**, v.165, n.2, p.691-702, 2000.

KLEIN, W.; TROMM, A.; GRIGA, T.; FRICKE, H.; FOLWACZNY, C.; HOCKE, M.; EITNER, K.; MARX, M.; DUERIG, N.; EPPLER, J.T. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor gene polymorphisms in inflammatory bowel diseases. **Genes Immun**, v.2, n.5, p.287-289, 2001.

KNIGHT, J.C.; UDALOVA, I.; HILL, A.V.; GREENSWOOD, B.B.; PESHU, N.; MARSH, K.; KWIATWOSKI, D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. **Nat Genet**, v.22, p.145-150, 1999.

KOCH, P.J.; WALSH, M.J.; SCHMELZ, M.; GOLDSCHMIDT, M.D.; ZIMBELMANN, R.; FRANKE, W.W. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. **Eur J Cell Biol**, v.53, p.1-12, 1990.

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

KÖRNER, H.; SEDGWICK, J.D. Tumor necrosis factor and lymphotoxin: Molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. **Immunol Cell Biol**, v.74, p.465-472, 1996.

KORNMAN, K.S.; DI GIOVINE, F.S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. **Ann Periodontol**, v.3, p.327-338, 1998.

KROEGER, K.M.; CARVILLE, K.S.; ABRAHAM, L.J. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol Immunol**, v.34, p.391-399, 1997.

KRUSE, S.; JAPHA, T.; TEDNER, M.; SPARHOLT, S.H.; FORSTER, J.; KUEHR, J.; DEICHMANN, K.A. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. **Immunology**, v.96, n.3, p.365-371, 1999.

KUBE, D.; PLATZER, C.; VON KNETHEN, A.; STRAUB, H.; BOHLEN, H.; HAFNER, M.; TESCH, H. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. **Cytokine**, v.7, n.1, p.1-7, 1995.

KUBE, D.; RIETH, H.; ESKDALE, J.; KREMSNER, P.G.; GALLAGHER, C. Structural characterization of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. **Genes Immun**, v.2, p.181-190, 2001.

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

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M.C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K. ET AL INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, p.860-921, 2001.

LANGDAHL, B.L.; LOKKE, E.; CARSTENS, M.; STENKJAER, L.L.; ERIKSEN, E.F. Osteoporotic fractures are associated with an 86-base pair repeat polymorphism in the interleukin-1-receptor antagonist gene but not with polymorphisms in the interleukin-1 beta gene. **J Bone Miner Res**, v.15, p.402-414, 2000.

LANZAVECCHIA, A. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? **J Exp Med**, v.181, n.6, p.1945-1948, 1995.

LAUTA, V.M. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. **Cancer**, v.97, n.10, p.2440-2452, 2003.

LE BEAU, M.M.; ESPINOSA, R.; NEUMAN, W.L.; STOCK, W.; ROUSLTON, D.; LARSON, R.A.; KEINANEN, M.; WESTBROOK, C.A. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.90, p.5484-5488, 1993.

LEVER, W.F.; SCHAUMBURG-LEVER, G. Noninfectious vesicular and bullous diseases. In: Lever, W.F. e Schaumburg-Lever, G. (Ed.). **Histopathology of the skin**. Philadelphia: Lippincott, 1990. p.103-151.

LI, N.; LIU, Z.; DIAZ, L.A. Pemphigus foliaceus autoantibodies recognize two dominant pathogenic epitopes located in EC1 and EC2 domains of Desmoglein-1. **J Invest Dermatol**, v.119, n.1, p.305, 2002.

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). **J Exp Med**, v.197, n.11, p.1501-1510, 2003.

LIE, B.A.; TODD, J.A.; POCIOT, F.; NERUP, J.; AKSELSEN, H.E.; JONER, G.; DAHL-JØRGENSEN, K.; RØNNINGEN, K.S.; THORSBY, E.; UNDLIEN, D.E. The predisposition to type 1 diabetes linked to the HLA complex (IDDM1) includes at least one non-class II gene. **Am J Hum Genet**, v.64, p.793-800, 1999.

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

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

LINKER-ISRAELI, M.; WALLACE, D.J.; PRHEN, R.; NAND, L.; LI, L.; KLINENBERG, J.R. A greater variability in the 3' flanking region of the IL-6 gene in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Autoimmunity**, v.23, p.199-209, 1996.

LINKER-ISRAELI, M.; WALLACE, D.J.; PRHEN, R.; MICHAEL, D.; HONDA, M.; TAYLOR, K.D.; PAUL-LABRADOR, M.; FISCHER-GHODSIAN, N.; FRASER, P.A.; KLINENBERG, J.R. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. **Genes Immun**, v.1, p.45-52, 1999.

LIO, D.; CANDORE, G.; COLOMBO, A.; COLONNA ROMANO, G.; GERVASI, F.; MARINO, V.; SCOLA, L.; CARUSO, C. A genetically determined high setting of TNF-alpha influences immunologic parameters of HLA-B8,DR3 positive subjects: implications for autoimmunity. **Hum Immunol**, v.62, n.7, p.705-713, 2001.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v.104, n.4, p.487-501, 2001.

LOMBARDI, C.; BORGES, P.C.; CHAUL, A. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Invest Dermatol**, v.98, p.847-850, 1992.

LÓPEZ-ROBLES, E.; AVALOS-DÍAZ, E.; VEGA-MEMIJÉ, E.; HOJYO-TOMOKA, T.; VILLALOBOS, R.; FRAIRE, S.; DOMÍNGUEZ-SOTO, L.; HERRERA-ESPARZA, R. TNF- $\alpha$  and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. **Int J Dermatol**, v.40, p.185-188, 2001.

LOUGHREY, B. V.; MAXWELL, A. P.; FOGARTY, D. G.; MIDDLETON, D.; HARRON, J. C.; PATTERSON, C. C.; DARKE, C.; SAVAGE, D. A. An interleukin 1B allele, which correlates with a high responder phenotype, is associated with diabetic nephropathy. **Cytokine**, v.10, p.984-988, 1998.

LOUIS, E.; FRANCHIMONT, D.; PIRON, A.; GEVAERT, Y.; SCHAAF-LAFONTAINE, N.; ROLAND, S.; MAHIEU, P.; MALAISE, M.; DE GROOTE, D.; LOUIS, R.; BELAICHE, J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clin Exp Immunol**, v.113, p.401-406, 1998.

LOZANO F, PLACES L, VILA JM, PADILLA O, ARMAN M, GIMFERRER I, SUAREZ B, LOPEZ DE LA IGLESIA A, MISERACHS N, VIVES J. Identification of a novel single-nucleotide polymorphism (Val554Ile) and definition of eight common alleles for human IL4RA exon 11. **Tissue Antigens**, v.57, n.3, p.216-220, 2001.

LÜFTL, M.; STAUBER, A.; MAINKA, A.; KLINGEL, R.; SCHULER, G.; HERTL, M. Successful removal of pathogenic autoantibodies in pemphigus by immunoadsorption with a tryptophan-linked polyvinylalcohol adsorber. **Br J Dermatol**, v.149, p.598-605, 2003.

LUOMALA, M.; LEHTIMAKI, T.; ELOVAARA, I.; WANG, X.; UKKONEN, M.; MATTILA, K.; LAIPPALA, P.; KOIVULA, T.; HURME, M. A study of interleukin-1 cluster genes in susceptibility to and severity of multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, v.185, n.2, p.123-127, 2001.

MADHOK, R.; CRILLY, A.; WATSON, J.; CAPELL, H.A. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlation with clinical and laboratory indices of disease activity. **Ann Rheum Dis**, v.52, p.232-234, 1993.

MAHONEY, M.; WANG, Z.H.; STANLEY, J.R. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. **J Invest Dermatol**, v.113, p.22-25, 1999.

MAKHATADZE, N.J. Tumor Necrosis Factor Locus: Genetic Organization and Biological Implications. **Hum Immunol**, v.59, p.571-579, 1998.

MALHEIROS, D.; ROXO, V.M.M.S.; BRAUN-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M.L. Pênfigo foliáceo endêmico e polimorfismo genético do auto-antígeno (Dsg1): existe alguma relação? In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. p.953. 1 CD-ROM.

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

MARSH, S.G.E.; PACKER, R.; HEYES, J.M.; BOLTON, B.; FAUCHET, R.; CHARRON, D.; BODMER, J.G. The 12<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop cell lines panel: list of cell lines. In: CHARRON, D. (Ed.). **Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications**. Paris: EDK Medical and Scientific International Publisher, 1997. v.1; p.633-647.

- MARTEL, P.; GILBERT, D.; DROUOT, L.; PROST, C.; RAUX, G.; DELAPORTE, E.; JOLY, P.; TRON, F. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. **Genes Immun**, v.2, p.41-43, 2001.
- MARTIN, M.P.; HARDING, A.; CHADWICK, R.; KRONICK, M.; CULLEN, M.; LIN, L.; MIGNOT, E.; CARRINGTON, M. Characterization of 12 microsatellite loci of the human MHC in a panel of reference cell lines. **Immunogenetics**, v.47, p.131-138, 1998.
- MATSUZAKA, Y.; MAKINO, S.; NAKAJIMA, K.; TOMIZAWA, M.; OKA, A.; KIMURA, M.; BAHRAM, S.; TAMIYA, G.; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class II region. **Tissue Antigens**, v.56, n.6, p.492-500, 2000.
- MATSUZAKA, Y.; MAKINO, S.; NAKAJIMA, K.; TOMIZAWA, M.; OKA, A.; BAHRAM, S.; KULSKI, J.K.; TAMIYA, G.; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. **Tissue Antigens**, v.57, n.5, p.397-404, 2001.
- MCDERMOTT, M.F. TNF and TNFR biology in health and disease. **Cell Mol Biol**, v.47, n.4, p.619-635, 2001.
- MCDOWELL, T.L.; SYMONS, J.A.; PLOSKI, R.; FORRE, O.; DUFF, G. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 $\alpha$  polymorphism. **Arthritis Rheum**, v.38, n.2, p.221-228, 1995.
- MEIJER, C.; HUYSEN, V.; SMEENK, T.; SWAAK, A.J. Profiles of cytokines (TNF alpha and IL6) and acute phase proteins (CRP and alpha IAG) related to the disease course in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.2, p.359-365, 1993.
- MERLOB, P.; METZKER, A.; HAZAZ, B.; ROGOVIN, H.; REISNER, S.H. Neonatal pemphigus vulgaris. **Pediatrics**, v.78, n.6, p.1102-1105, 1986.
- MILLER, R.P. RxC: A program for the analysis of contingency tables via the Metropolis Algorithm. Computer software distributed by author, 1997.
- MITSUYASU, H.; IZUHARA, K.; MAO, X.Q.; GAO, P.S.; ARINOBU, Y.; ENOMOTO, T.; KAWAI, M.; SASAKI, S.; DAKE, Y.; HAMASAKI, N.; SHIRAKAWA, T.; HOPKIN, J.M. Ile50Val variant of IL4Ra upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. **Nat Genet**, v.19, p.119-120, 1998.
- MONTERO-JULIAN, F.A. The soluble IL6-receptors: serum levels and biological function. **Cell Mol Biol**, v.47, n.4, p.583-597, 2001.
- MONCADA, B.; KETTELSEN, S.; HERNANDEZ-MOCTEZUMA, J.L.; RAMIREZ, F. Neonatal pemphigus vulgaris. Role of passively transferred pemphigus antibodies. **Br J Dermatol**, v.106, p.465-468, 1982.
- MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v.19, p.683-765, 2001.

- MORAES, J.R.; MORAES, M.E.; FERNANDEZ-VINA, M.; DIAZ, L.A.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.T.; ALVAREZ, R.R.; SAMPAIO, S.A.; RIVITTI, E.A.; STASTNY, P. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**, v.33, p.388-391, 1991.
- MORAES, M.E.; FERNANDEZ-VINA, M.; LAZARO, A.; DIAZ, L.A.; HANZ-FILHO, G.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E.; AOKI, V.; STASTNY, P.; MORAES, J.R. 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, p.35-40, 1997.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clones: 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v.136, p.2348-2357, 1986.
- MOUT, R.; WILLENZE, R.; LANDEGENT, J.E. Repeat polymorphisms in the interleukin-4 gene (IL4). **Nucleic Acids Res**, v.19, p.3763, 1991.
- MURAGUCHI, A.; KISHIMOTO, T.; MIKI, T.; KURITANI, T.; KAIEDA, T.; YOSHIZAKI, K.; YAMAMURA, Y. T-cell replacing factor (TRF) - induced IgG secretion in human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. **J Immunol**, v.127, p.412-416, 1981.
- MURPHY, K.M.; OUYANG, W.; FARRAR, J.D.; YANG, J.; RANGANATH, S.; ASNAGLI, H.; AFKARIAN, M.; MURPHY, T.L. Signaling and transcription in T helper development. **Annu Rev Immunol**, v.18, p.451-494, 2000.
- NAITO, K.; MORIOKA, S.; NAKAJIMA, S.; OGAWA, H. Proteinase inhibitors block formation of pemphigus acantholysis in experimental models of neonatal mice and skin explants: Effects of synthetic and plasma proteinase inhibitors on pemphigus acantholysis. **J Invest Dermatol**, v.93, p.173-177, 1989.
- NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res**, v.4, supl. 3, p.233-242, 2002.
- NAKASHIMA, H.; MIYAKE, K.; INOUE, Y.; SHIMIZU, S.; AKAHOSHI, M.; TANAKA, Y.; OTSUKA, T.; HARADA, M. Association between IL-4 genotype and Il-4 production in the Japanese population. **Genes Immun**, v.3, n.2, p.107-109, 2002.
- NEDOSPASOV, S.A.; UDALOVA, I.A.; KUPRASH, D.V.; TURETSKAYA, R.L. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene. **J Immunol**, v.147, p.1053-1059, 1991.
- NEDWIN, G.E.; NAYLOR, S.L.; SAKAGUCHI, A.Y.; SMITH, D.; JARRETT-NEDWIN, J.; PENNICA, D.; GOEDDEL, D. V.; GRAY, P. W. Human Lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Res**, v.13, p.6361-6373, 1985.

NELMS, K.; KEGAN, A.D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J.J.; PAUL, W.E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu Rev Immunol**, v.17, p.701-738, 1999.

NEMETZ, A.; NOSTI-ESCANILLA, M. P.; MOLNAR, T.; KOPE, A.; KOVACS, A.; FEHER, J.; TULASSAY, Z.; NAGY, F.; GARCIA-GONZALEZ, M. A.; PENNA, A. S. IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease. **Immunogenetics**, v.49, n.6, p.527-531, 1999.

NICKLIN, M.J.H.; WEITH, A.; DUFF, G.W. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-1 receptor antagonist genes. **Genomics**, v.19, p.382-384, 1994.

NISHIFUJI, K.; AMAGAI, M.; KUWANA, M.; IWASAKI, T.; NISHUKAWA, 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. **J Invest Dermatol**, v.114, p.88-94, 2000.

NOGUCHI, E.; SHIBASAKI, M.; ARINAMI, T.; TAKEDA, K.; YOKOUCHI, Y.; KAWASHIMA, T.; YANAGI, H.; MATSUI, A.; HAMAGUCHI, H. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. **Clin Exp Allergy**, v.28, p.449-453, 1998.

NOUSARI, H.C.; KIMYAI-ASADI, A.; ANHALT, G.J. Elevated serum levels of interleukin-6 in araneoplastic pemphigus. **J Invest Dermatol**, v.112, n.3, p.396-397, 1999.

O'GARRA, A.; ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. **Trends Cell Biol**, v.10, p.542-550, 2000.

OLAVESSEN, M.G.; HAMPE, J.; MIRZA, M.M.; SAIZ, R.; LEWIS, C.M.; BRIDGER, S.; TEARE, D.; EASTON, D.F.; HERRMANN, T.; SCOTT, G.; HIRST, J.; SANDERSON, J.; HODGSON, S.V.; LEE, J.; MACPHERSON, A.; ACHREIBER, S.; LENNARD-JONES, J.E.; CURRAN, M.E.; MATHEW, C.G. Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 receptor gene for association with inflammatory bowel disease. **Immunogenetics**, v.51, n.1, p.1-7, 2000.

OLOMOLAIYE, O.O.; WOOD, N.A.P.; BIDWELL, J.L. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. **Eur J Immunogenet**, v.25, p.267, 1998.

ONISHI, M.; NOSAKA, T.; KITAMURA, T. Cytokine receptors: structures and signal transduction. **Int Rev Immunol**, v.16, p.617-634, 1998.

PASCUAL, M.; NIETO, A.; MATARAN, L.; BALSAL, A.; PASCUAL-SALCEDO, D.; MARTIN, J. IL6 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis. **Genes Immun**, v.1, n. 5, p.338-340, 2000.

PASCUAL, M.; MATARÁN, L.; JONES, G.; SHING, D.; VAN DER SLIK, A.R.; GIPHART, M.J.; SCHREUDER, G.M.TH.; DE VRIES, R.R.P.; BREEDVELD, F.C.; ROOVERS, E.; ZANELLI, E.; MARTÍN, J. HLA haplotypes and susceptibility to rheumatoid arthritis. More than class II genes. **Scand J Rheumatol**, v.31, p.275-278, 2002.

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 Immun**, v.4, p.110-116, 2003.

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

POCIOT, F.; MOLVIG, J.; WOGENSEN, L.; WORSAAE, H.; NERUP, J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1b (IL-1b) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. **Eur J Clin Invest**, v.22, p.396-402, 1992.

POCIOT, F.; BRIANT, L.; JONGENEEL, C.V.; MOLVIG, J.; WORSAAE, H.; ABBAL, M.; THOMSEN, M.; NERUP, J.; CAMBON-THOMSEN, A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Immunol**, v.23, p.224-231, 1993.

PRICE, P.; WITT, C.; ALLCOCK, R.; SAYER, D.; GARLEPP, M.; KOK, C.C.; FRENCH, M.; MALLAL, S.; CHRISTIANSEN, F. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. **Immunol Rev**, v.167, p.257-274, 1999.

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

RAHA-CHOWDHURY, R.; BOWEN, D.J.; STONE, C.; POINTON, J.J.; TERWILLINGER, J.D.; SHEARMAN, J.D.; ROBSON, K.J.H.; BOMFORD, A.; WORWOOD, M. New polymorphic microsatellite markers place the haemochromatosis gene telomeric to D6S105. **Hum Mol Genet**, v.4, p.1869-1874, 1995.

REYNARD, M.P.; TURNER, D.; NAVARRETE, C.V. Allele frequencies of polymorphism of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. **Eur J Immunol**, v.27, n.4, p.241-249, 2000.

RIECKMANN, P.; TUSCANO, J.M.; KEHRL, J.H. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in B-lymphocyte function. **Methods**, v.11, p.128-132, 1997.

RIVERA-CHAVEZ, F.A.; PETERS-HYBKI, D.L.; BARBER, R.C.; O'KEEFE, G.E. Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. **Shock**, v.20, n.3, p.218-223, 2003.

ROBINSON, N.D.; HASHIMOTO, T.; AMAGAI, M.; CHAN, L.S. The new pemphigus variants. **J Am Acad Dermatol**, v.40, p.763-766, 1999.

ROCHA-ALVAREZ, R.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.T.; Souza-Aguiar, L.; Martí-Castro, R.; Diaz, L.A. Pregnant women with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) give birth to disease-free babies. **J Invest Dermatol**, v.99, n.1, p.78-82, 1992.

ROCK, B.; MARTINS, C.R.; THEOFILOPOULOS, A.N.; BALDERAS, R.S., ANHALT, G.J.; LABIB, R.S.; FUTAMURA, S.; RIVITTI, E.A. AND DIAZ, L.A. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **N Engl J Med**, v.320, p.1463-1469, 1989.

ROMAGNANI, S. Human Th1 and Th2 subsets: Doubt no more. **Immunol Today**, v.12, p.256-257, 1991.

ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.85, n.1, p.9-18, 2000.

ROSA-ROSA, L.; ZIMMERMANN, N.; BERNSTEIN, J.A.; ROTHENBERG, M.E.; KHURANA-HERSHEY, G.K. The R576 IL-4 receptor alpha allele correlates with asthma severity. **J Allergy Clin Immunol**, v.104, p.1008-1014, 1999.

ROSCOE, J.T.; DIAZ, L.A.; SAMPAIO, S.A.; CASTRO, R.M.; LABIB, R.S.; TAKAHASHI, Y.; PATEL, H.; ANHALT, G.J. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. **J Invest Dermatol**, v.85, p.538-541, 1985.

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

ROSENWASSER, L.J.; BORISH, L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). **Am J Respir Crit Care Med**, v.156, n.4, supl., p.S152-S155, 1997.

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

ROXO, V.M.; PEREIRA, N.F.; PAVONI, D.P.; LIN, M.T.; HANSEN, J.A.; DE O POERSCH, C.; FILHO, A.M.; PETZL-ERLER, M.L. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus--are there any associations? **Tissue Antigens**, v.62, n.5, p.394-400, 2003.

SACK, U.; KINNE, R.; MARX, T.; HEPPT, P.; BENDER, S.; EMMRICH, F. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v.13, p.45-51, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 2. ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMI, N.; BHOL, K.C.; AHMED, A.R. Influence of IVIG therapy on autoantibody titers to desmoglein 1 in patients with pemphigus foliaceus. **Clin Immunol**, v.105, n.2, p.192-198, 2002.

SAMPAIO, S.A.; RIVITTI, E.A.; AOKI, V.; DIAZ, L.A. Brazilian pemphigus foliaceus, endemic pemphigus foliaceus, or fogo selvagem (wild fire). **Dermatol Clin**, v.12, p.765-776, 1994.

SANDFORD, A.J.; CHAGANI, T.; ZHU, S.; WEIR, T.D.; BAI, T.R.; SPINELLI, J.J.; FITZGERALD, J.M.; BEHBEHANI, N.A.; TAN, W.C.; PARE, P.D. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. **J Allergy Clin Immunol**, v.106, p.135-140, 2000.

SANTI, C.G.; SOTTO, M.N. Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Am Acad Dermatol**, v.44, p.446-450, 2001.

SCAREL-CARMINAGA, R.M.; TREVILATTO, P.C.; SOUZA, A.P.; BRITO JR, R.B.; LINE, S.R.P. Frequencies of hte -330 (T→G) IL-2 and -590 (T→C) IL-4 gene polymorphisms in a population from south-eastern Brazil. **Eur J Immunogenet**, v.29, p.292-296, 2002.

SCHMIDT, E.; BASTIAN, B.; DUMMER, R.; TONY, H.P.; BROCKER, E.B.; ZILLIKENS, D. Detection of elevated levels of IL-4, IL-6 and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid. **Arch Dermatol Res**, v.288, p.353-357, 1996.

SCHNEIDER, R.F.; ROESSLY, D.; EXCOFIER, L. ARLEQUIN: A software for population genetic data analysis, version 2,000. Geneva: Genetics and Biometry Lab., Department of Anthropology, University of Geneva, 2000.

SCHOTTE, H.; SCHLUTER, B.; RUST, S.; ASSMANN, G.; DOMSCHKE, W.; GAUBITZ, M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v.40, n.4, p.393-400, 2001.

SEISHIMA, M.; IWASAKI-BESSHO, Y.; ITOH, Y.; NOZAWA, Y.; AMAGAI, M.; KITAJIMA, Y. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, but not phospholipase D, is involved in pemphigus IgG-induced signal transduction. **Arch Dermatol Res**, v.291, p.606-613, 1999.

SEKI, N.; KAMIZONO, S.; YAMADA, A.; HIGUCHI, T.; MATSUMOTO, H.; NIIYA, F.; KIMURA, A.; TSUCHIYA, K.; SUZUKI, R.; DATE, Y.; TOMITA, T.; ITOH, K.; OCHI, T. Polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in patients with rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v.54, p.194-197, 1999.

SHIMIZU, H.; NISHIKAWA, T.; HASHIMOTO, T.; KIKUCHI, A.; ISHIKO, A.; MASUNAGA, T. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera show an inversely graded binding pattern to extracellular regions of desmosomes in different layers of human epidermis. **J Invest Dermatol**, v.105, p.153-159, 1995.

SIMS, J.E. IL-1 and IL18 receptors, and their extended family. **Curr Opin Immunol**, v.14, n.1, p.117-122, 2002.

- SKOOG, T.; VAN'T HOOFT, F.M.; KALLIN, B.; JOVINGE, S.; BOQUIST, S.; NILSSON, J.; ERIKSSON, P.; HAMSTEN, A. A common functional polymorphism (C→A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene associated with reduced circulating levels of TNF- $\alpha$ . **Hum Mol Genet**, v.8, n.8, p.1443-1449, 1999.
- SONG, Z.; CASOLARO, V.; CHEN, R.; GEORAS, S.N.; MONOS, D.; ONO, S.J. Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. **J Immunol**, v.156, n.2, p.424-429, 1996.
- SPILLMAN, D.H.; MAGNIN, P.H.; ROQUET, I. Aprotinin inhibition of experimental pemphigus in Balb-c mice following transfer of pemphigus foliaceus serum. **Clin Exp Dermatol**, v.12, p.321-327, 1988.
- SPRONK, P.E.; TER BORG, E.J.; LIMBURG, P.C.; KALLENBERG, C.G. Plasma concentration of Il-6 in systemic lupus erythematosus; an indicator of disease activity? **Clin Exp Immunol**, v.90, p.106-110, 1992.
- SULLIVAN, K.E.; WOOTEN, C.; SCHMECKPEPER, B.J.; GOLDMAN, D.; PETRI, M.A. A promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans. **Arthritis Rheum**, v.40, p.2207-2211, 1997.
- SUTHERLAND, G.R.; RICHARDS, R.I. Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.92, p.3636-3641, 1995.
- SUZUKI, I.; YAMAGUCHI, E.; HIZAWA, N.; ITOH, A.; KAWAKAMI, Y. A new polymorphism in the 5' flanking region of the human interleukin (IL)-4 gene. **Immunogenetics**, v.49, p.738-739, 1999.
- TAGORE, A.; GONSALKORALE, W. M.; PRAVICA, V.; HAJEER, A. H.; MCMAHON, R.; WHORWELL, P. J.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. **Tissue Antigens**, v.54, n.4, p.386-390, 1999.
- TAKABAYASHI, A.; IHARA, K.; SASAKI, Y.; KUSUHARA, K.; NISHIMA, S.; HARA, T. Novel polymorphism in the 5'-untranslated region of the interleukin-4 gene. **J Hum Genet**, v.44, p.352-353, 1999.
- TAKABAYASHI, A.; IHARA, K.; SASAKI, Y.; SUZUKI, Y.; NISHIMA, S.; IZUHARA, K.; HAMASAKI, N.; HARA, T. Childhood atopic asthma: positive association with a polymorphism of IL-4 receptor alpha gene but not with that of IL-4 promoter or Fc epsilon receptor I beta gene. **Exp Clin Immunogenet**, v.17, n.2, p.63-70, 2000.
- TAMIYA, G.; SHIINA, T.; OKA, A.; TOMIZAWA, M.; OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; YOSHITOME, M.; MAKINO, S.; KIMURA, M.; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class I region. **Tissue Antigens**, v.54, p.221-228, 1999.

TARLOW, J.K.; BLAKEMORE, A.I.; LENNARD, A.; SOLARI, R.; HUGHES, H.N.; STEINKASSERER, A.; DUFF, G.W. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. **Hum Genet**, v.91, n.4, p.403-404, 1993.

TERAKI, Y.; HOTTA, T.; SHIOHARA, T. Skin-homing interleukin-4 and -13-producing cells contribute to bullous pemphigoid: remission of disease is associated with increased frequency of interleukin-10-producing cells. **J Invest Dermatol**, v.117, n.5, p.1097-1102, 2001.

TERRY, C.F.; LOUKACI, V.; GREEN, F.R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin-6 (IL6) transcriptional regulation. **J Biol Chem**, v.275, n.24, p.18138-18144, 2000.

TODD, S.; NAYLOR, S.L. Dinucleotide repeat polymorphism in the human interleukin-1, alpha gene (IL1A). **Nucleic Acids Res**, v.19, p.3756, 1991.

TOTO, P.; FELICIANI, C.; AMERIO, P.; SUSUKI, H.; WANG, B.; SHIVJI, G.M.; WOODLEY, D.; SAUDER, D.N. Immune modulation in pemphigus vulgaris: role of CD28 and IL-10. **J Immunol**, v.164, p.522-529, 2000.

TOUNTAS, N.; COMINELLI, F. Identification and initial characterization of two polymorphisms in the human interleukin-10 promoter. **Eur Cytokine Netw**, v.7, p.578, 1996.

TOUNTAS, N.A.; CASINI-RAGGI, V.; YANG, H.; DI GIOVINE, F.S.; VECCHI, M.; KAM, L.; MELANI, L.; PIZARRO, T.T.; ROTTER, J.I.; COMINELLI, F. Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.117, n.4, p.806-813, 1999.

TREVILATTO P.C.; SCAREL-CAMINAGA R.M.; DE BRITO R.B JR.; DE SOUZA A.P.; LINE S.R. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. **J Clin Periodontol**, v.30, n.5, p.438-442, 2003.

TSENG LH, CHEN PJ, LIN MT, SINGLETON K, MARTIN EG, YEN AH, MARTIN PJ, HANSEN JA. Simultaneous genotyping of single nucleotide polymorphisms in the IL-1 gene complex by multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **J Immunol Methods**, v.267, n.2, p.151-156, 2002a.

TSENG, L.-H.; CHEN, P.J.; LIN, M.T.; SINGLETON, K.; MARTIN, E.G.; YEN, A.-H.; CHUANG, S.-M.; MARTIN, P.J.; HANSEN, J.A. Simultaneous genotyping of single nucleotide polymorphisms in the IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  and TNF $\beta$  genes. **Tissue Antigens**, v.59, n.4, p.280-286, 2002b.

TURNER, D.M.; GRANT, S.C.; LAMB, W.R.; BRENCHLEY, P.E.; DYER, P.A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. **Transplantation**, v.60, p.1113-1117, 1995.

TURNER, D.M.; WILLIAMS, D.M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, D.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, v.24, p.1-8, 1997.

UDALOVA, I.A.; NEDOSPASOV, S.A.; WEBB, G.C.; CHAPLIN, D.D.; TURETSKAYA, R.L. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. **Genomics**, v.16, p.180-186, 1993.

UGLIALORO, A.M.; TURBAY, D.; PESAVENTO, P.A.; DELGADO, J.C.; MCKENZIE, F.E.; GRIBBEN, J.G.; HARTL, D.; YUNIS, E.J.; GOLDFELD, A.E. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. **Tissue Antigens**, v.52, p.359-367, 1998.

VANDENBROECK, K.; MARTINO, G.; MARROSU, M.; CONSIGLIO, A.; ZAFFARONI, M.; VACCARGIU, S.; FRANCIOTTA, D.; RUGGERI, M.; COMI, G.; GRIMALDI, L.M. Occurrence and clinical relevance of an interleukin-4 gene polymorphism in patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v.76, p.189-192, 1997.

VANNIER, E.; MILLER, L.C.; DINARELLO, C.A. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin 4: Interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p.4076-4080, 1992.

VERDOLINI, R.; CERIO, R. Autoimmune subepidermal bullous skin diseases: the impact of recent findings for the dermatopathologist. **Virchows Arch**, v.443, p.184-193, 2003.

WAHREN-HERLENIUS, M.; HARRIS, H.E.; LARSSON, P.; KLARESKOG, L. Cytokines in human rheumatoid arthritis and murine models. In: KUCHROO, V.K.; SARVETNIK, N.; HAFLER, D.A.; NICHOLSON, L. B. (Ed.). **Cytokines and Autoimmune Diseases**. Totowa: Humana Press, 2002. p.317-354.

WALLEY, A.J.; COOKSON, W.O.C.M. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. **J Med Genet**, v.33, p.689-692, 1996.

WALTER, M.R. Structure of interleukin-10/interleukin-10R1 complex: a paradigm for class 2 cytokine activation. **Immunol Res**, v.26, p.303-308, 2002.

WANG, X.Y.; HURME, M.; JYLHA, M.; HERVONEN, A. Lack of association between human longevity and polymorphisms of IL-1 cluster, IL-6, IL-10 and TNF-alpha genes in Finnish nonagenarians. **Mech Ageing Dev**, v.123, n.1, p.29-38, 2001.

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

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

WEBB, A.C.; COLLINS, K.L.; AURON, P.E.; EDDY, R.L.; NAKAI, H.; BYERS, M.G.; HALEY, L.L.; HENRY, W.M.; SHOWS, T.B. Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. **Lymphokine Res**, v.5, p.77-85, 1986.

WEINER, H.L. Role of cytokines in multiple sclerosis and in mucosal tolerance. In: KUCHROO, V.K.; SARVETNIK, N.; HAFLER, D.A.; NICHOLSON, L. B. (Ed.). **Cytokines and Autoimmune Diseases**. Totowa: Humana Press, 2002. p.273-293.

WEISSENSTEINER, T.; LANCHBURY, J.S. TNFB polymorphisms characterize three lineages of TNF region microsatellite haplotypes. **Immunogenetics**, v.47, p.6-16, 1997.

WIERENGA, E.A.; SNOEK, M.; DE GROOT, C.; CHRETIEN, I.; BOS, J.D.; JANEN, H.M.; KAPSENBERG, M.L. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic patients. **J Immunol**, v.144, p.4651-4656, 1990.

WILKINSON, R.J.; PATEL, P.; LIEWELYN, M.; HIRSCH, C.S.; PASVOL, G.; SNOUNOU, G.; DAVIDSON, R.N.; TOOSI, Z. Influence of polymorphism in the genes for interleukin 1 (IL)-1 receptor antagonist and IL-1B on tuberculosis. **J Exp Med**, v.189, n.12, p.1863-1873, 1999.

WILSON, A.G.; SYMONS, J.A.; MCDOWELL, T.L.; MCDEVITT, H.O.; DUFF, G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.3195-3199, 1997.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann Hum Genet**, v.19, p.251-253, 1955.

WU, H.; WANG, H.; YAN, A.; LYLE, S.; FAKHARZADEH, S.; WAHL, J.K.; WHEELLOCK, M.J.; ISHIKAWA, H.; UITTO, J.; AMAGAI, M.; STANLEY, J.R. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. **New Engl J Med**, v.343, n.1, p.31-35, 2000.

YASUKAWA, K.; HIRANO, T.; WATANABE, Y.; MURATANI, K.; MATSUDA, T.; NAKAI, S.; KISHIMOTO, T. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. **EMBO J.**, v.6, n.10, p.2939-2945, 1987.

ZEOTI, D.M.; FIGUEIREDO, J.F.C.; CHIOSSI, M.P.V.; ROSELINO, A.M.F. Serum cytokines in patients with Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Braz J Med Biol Res**, v.33, n.9, p.1065-1068, 2000.

ZULIANI, G.; HOBBS, H.H. A high frequency of length polymorphisms in repeated sequences adjacent to Alu sequences. **Am J Hum Genet**, v.46, p.963-969, 1990.