

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Biomarcadores Genéticos e Circulantes associados às catecolaminas (COMT, β 2AR e TMRS) na Psoríase

Joana Godinho Pereira

Dissertação

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Biomarcadores Genéticos e Circulantes associados às catecolaminas (COMT, β 2AR e TMRS) na Psoríase

Dissertação orientada por:

Prof. Doutor Manuel Bicho, Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da
Universidade de Lisboa

Prof. Doutora Ângela Inácio, Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da
Universidade de Lisboa

Joana Godinho Pereira

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2012

AGRADECIMENTOS

Foram várias as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e concretização desta etapa tão importante, e às quais quero deixar o meu profundo agradecimento.

Ao Professor Doutor Manuel Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa e Director do Laboratório de Genética, pela oportunidade concedida e por todo o apoio prestado.

À Doutora Ângela Inácio por todos os esclarecimentos e dedicação.

Ao serviço de Dermatologia do Hospital de Santa Maria, na pessoa do Professor Doutor Paulo Filipe e da Dra. Joana Antunes por me terem possibilitado desenvolver este trabalho e pela disponibilidade prestada.

À Dra. Joana Ferreira, Irina Alho e Andreia Matos, Técnica Conceição Afonso, Ângela Gil, pela ajuda prestada durante o decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Aos restantes Colegas, nomeadamente Diana Campelo, Rafaela Cabaça, José Albuquerque e Joana Cardoso pela ajuda demonstrada.

Queria deixar um agradecimento especial à minha família, nomeadamente à minha mãe e ao meu pai por todo o apoio, paciência, esforço e dedicação na minha educação e formação; ao meu irmão por estes anos de convivência e aprendizagem juntos; aos meus avós e tios que sempre me apoiaram neste longo percurso, bem como ao Félix Romero pela ajuda e disponibilidade prestada.

Aos meus grandes amigos, Filipa Mimoso, Liliana Cardoso, Joana Teotónio, Andreia Tavares, Carolina Cassona e Gabriela Henriques pela amizade, apoio emocional, vivências experienciadas em conjunto e pelos vários pedidos de ajuda nunca recusados.

Por fim aos restantes amigos e colegas de vida académica, nomeadamente, Nuno Carvalho, Marcelo Ferreira, Bruno Freitas, Joana Viana, Patrícia Apura, Joana Lopes, Mariana Fugas, Joana Figueiredo, pela amizade, convívio e ajuda prestada.

Um sincero Obrigada a Todos.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE QUADROS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
1. Epidemiologia	1
2. Patogénese	1
3. Genética.....	3
4. Tipos clínicos	4
5. Gravidade clínica da Psoríase.....	4
6. Terapêutica	4
6.1. <i>Terapêutica tópica</i>	4
6.2. <i>Fototerapia</i>	5
6.3. <i>Terapêutica Sistémica</i>	5
6.3.1. <i>Terapêutica Biológica</i>	5
7. Comorbilidades	5
8. Inflamação e catecolaminas.....	6
9. Redutase Transmembranar dos Eritrócitos.....	7
10. Psoríase e Polimorfismos genéticos	8
10.1. <i>Receptor beta adrenérgico (ADR β2)</i>	8
10.2. <i>Catecol-O-metiltransferase(COMT)</i>	9
OBJECTIVOS	11
METODOLOGIA	12
1. Descrição da População.....	12
2. Extracção de DNA.....	12
3. Quantificação de DNA	12
5. Genótipagem dos indivíduos	13
6. Actividade da Redutase Transmembranar Eritrocitária.....	14
7. Análise Estatística	14
RESULTADOS	16

1. Análise Descritiva da população	16
2. Redutase transmembranar do ferricianeto dependente de NADH.....	17
3. Análise do polimorfismo ADR β 2.....	18
4. Análise do polimorfismo COMT	19
5. Relação entre Polimorfismos e Actividade da RTM.....	20
6. PASI e os Parâmetros em estudo.....	21
DISCUSSÃO.....	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
BIBLIOGRAFIA.....	30
ANEXOS.....	I

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AC	Adenilato Ciclase
AD	Adrenalina
ADR β 2	Receptor Adrenérgico β 2
APCs	Células apresentadoras de Antígeno
Arg	Arginina
Ca ²⁺	Ião cálcio
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclico
CAs	Catecolaminas
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
CD	Células dendríticas
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
Células NK	Células Natural killer
COMT	Catecol-O-metiltransferase
COMT ^H	Catecol-O-Metiltransferase com alta actividade
COMT ^L	Catecol-O-Metiltransferase com baixa actividade
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Cys	Cisteína
DBP	Dopamina- β -Hidroxilase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fe ²⁺	Ferro ferroso
Fe ³⁺	Ferro férrico
FNMT	Fenilamina-N-metiltransferase
G	Guanina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-20	Interleucina 20
IL-23	Interleucina 23
IL-6	Interleucina 6
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INF	Interferão
INF γ	Interferão gama
L-DOPA	L-Dopamina
LFA-1	Leukocyte-function-associated antigen-1
MAO	Monoamina Oxidase
MB-COMT	Membrane bound COMT
Met	Metionina

mg	Miligrama
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Major
mL	Mililitro
mM	MiliMolar
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido
NE	Norepinefrina ou Noradrenalina
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
OR	Odds Ratio
PASI	Índice de área e gravidade de Psoríase
pb	pares de base
PBMCs	Células mononucleares sanguíneas periféricas humanas
PCR	Polymerase chain reaction
pDCs	Células Dendriticas plamócitoides
PSORS	Psoríase susceptibility
PUVA	Fototerapia com radiação UV A
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rpm	Rotações por minuto
RTM	Redutase Transmembranar
SAM	S-Adenosil-L-Metionina
S-COMT	COMT solúvel
Ser	Serina
SNP	Single Nucleotide Polymorfism
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TH	Tirosina Hidroxilase
Th1	Célula T helper tipo 1
Th17	Célula T helper tipo 17
TMRS	Eritrocyte Transmembrane Redox System
TNF α	Tumor Necrosis Factor alfa
Trh	Treonina
UVA	Radiação ultra violeta A
Val	Valina
VLA-1	Very late antigen 1
μ L	Microlitro
pmol	Picomole

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da possível hipótese da evolução da lesão Psoriásica	2
Figura 2 - Representação do gene do receptor β -2-adrenérgico	9
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura do gene da COMT	10
Figura 4 - Gráfico representativo da relação entre a actividade da redutase transmembranar e o PASI.	22
Figura 5 - Gel de restrição do gene COMT	I
Figura 6 - Gel de restrição do gene ADR β 2	I
Figura 7 - Curva de Calibração do Ferrocianeto, necessária à técnica "Actividade da Redutase Transmembranar"	VI

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Primers e condições do PCR-RFLP	13
Quadro 2 - Metodologia usada e fragmentos de restrição possíveis de obter no estudo dos polimorfismos do gene COMT e ADR β 2 através da técnica de RFLP.....	14
Quadro 3 - Análise descritiva da característica idade da população em estudo.	16
Quadro 4- Análise descritiva da característica Género da população em estudo.	17
Quadro 5 - Actividade da redutase transmembranar do ferricianeto eritrocitária dependente de NADH no grupo controlo e no grupo de doentes Psoriásicos.	17
Quadro 6 - Frequências genotípica e alélica do polimorfismo Arg16Gly do gene ADR β 2 nos indivíduos controlo e doentes.....	19
Quadro 7 - Risco relativo para a associação entre os alelos do receptor ADR β 2 e a psoríase.....	19
Quadro 8 - Frequências genotípica e alélica do polimorfismo Val158Met do gene COMT nos indivíduos Psoriásicos e controlos	20
Quadro 9 - Estatística associativa entre os polimorfismos e actividade da Redutase transmembranar com o PASI	22
Quadro 10 - Risco relativo para a associação entre os alelos da COMT e a psoríase	II
Quadro 11 - Associações entre os polimorfismos da COMT e a Actividade da Redutase Transmembranar na população controlo e doente.....	II
Quadro 12 - Associações entre os polimorfismos da ADR β 2 e a Actividade da Redutase transmembranar na população controlo e doente	II
Quadro 13 - Comparação entre a distribuição do valor da RTM pelos genótipos da COMT entre controlos e doentes.	II
Quadro 14 - Comparação entre a distribuição do valor da RTM pelos genótipos do ADR β 2 entre controlos e doentes.	III

RESUMO

A Psoríase é uma doença inflamatória crónica mediada por processos imunitários, caracterizada por erupções cutâneas e que afecta cerca de 2-3% da população mundial. O tipo clínico mais comum é a psoríase vulgar, que tipicamente tem como fenótipo o aparecimento de placas por todo o corpo. Apesar de a sua etiologia ser desconhecida, sabe-se que esta é uma doença onde existe uma hiperproliferação dos queratinócitos, associada a uma desregulação imune.

No geral os estudos genéticos de associação são importantes na medida em que permitem associar os polimorfismos ao risco de aparecimento de doenças, bem como à sua evolução. Os estudos bioquímicos dos componentes do sangue também são importantes, de modo a verificar se existem enzimas circulantes de células ou do plasma cujas alterações ao nível da sua actividade (aumento ou diminuição) sejam o reflexo (*proxy*) de distúrbios locais em proteínas envolvidas no metabolismo e mecanismos de acção que afectem o desenvolvimento da doença.

Dadas as catecolaminas (CAs) estarem muito associadas com vias de sinalização do sistema imune, e particularmente com mecanismos de inflamação, característica da psoríase, o presente trabalho focou-se no estudo de duas variantes polimórficas de substituição (SNPs): 1) no codão 16 de gene do receptor β 2-adrenérgico (ADR β 2), que está envolvido na resposta às catecolaminas; 2) no codão 158 da Catechol-O-Metiltransferase (COMT), enzima que metaboliza as catecolaminas. Foi ainda estudada a actividade da Redutase Transmembranar do Ferricianeto dependente de NADH intracelular do eritrócito, que reduz o ferricianeto a ferrocianeto, e cuja acção é modulada por receptores β 2-adrenérgicos.

Os resultados mostram que poderão existir diferenças significativas na actividade da Redutase Transmembranar (RTM) nos indivíduos Psoriásicos, apresentando estes, valores diminuídos. Parece ainda existir uma correlação entre os valores elevados do Índice de Área e Gravidade da Psoríase (PASI) e valores mais baixos da actividade da RTM. Foi encontrada uma tendência na associação da variante Val158 do gene da COMT e a doença. Sendo que no caso do polimorfismo Arg16Gly, parece existir uma tendência para o alelo Gly16 constituir um factor de risco para a psoríase. No entanto os resultados encontram-se condicionados pelo tamanho e características da amostragem.

Palavras-chave: Psoríase, polimorfismos, COMT, Redutase Transmembranar, ADR β 2.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic, immune-mediated skin disease, which affects approximately 2-3% of the worldwide population. The most common clinical type is psoriasis vulgaris, which presents the appearance of plaques all over the body as the clinical phenotype.

Despite its unknown etiology, it is well established that the physiopathology of this disease is associated with a hyper proliferation of keratinocytes and an immunologic deregulation.

Genetic studies are important, because they allow us to associate polymorphisms with the risk for a disease, as well as the response to therapeutics. Biochemical studies are also important in order to verify the existence of modifications in enzymatic activities (up or down regulated) that are potentially involved in the progression of the disease.

In psoriasis, catecholamines may have an important role, since they are associated with immune pathways, particularly with inflammation mechanisms, a characteristic of this disease. In this context, association studies between the disease and two single nucleotide polymorphisms were performed. The polymorphisms were in: 1) codon 16 of the β 2-adrenergic receptor a protein involved in response to catecholamines; 2) codon 158 of the Catechol-O-Methyltransferase (COMT), an enzyme that metabolizes catecholamines. It was also studied the effect of the variation of the activity of NADH-dehydrogenase of the erythrocytes in the disease. This enzyme reduces the ferricyanide to ferrocyanide, and its activity is modulated by β 2-adrenergic receptors.

Results show significant differences in the activity of the NADH-dehydrogenase in the erythrocytes of psoriatic patients, which present lower values. Also it appears to exist a correlation between high values of the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) and lower values of the activity of the NADH-dehydrogenase in the erythrocyte of psoriatic patients. It was found a possible relation between the genotype COMT^{HH} as well as the allele Gly16 of the ADR β 2 with the risk to develop psoriasis. Results suggest an association between the activity of the NADH-dehydrogenase as well as the Val158 of the COMT gene and the Gly16 of the ADR β 2 with the disease, although these results are conditioned by the size of the sampling.

Key words: Psoriasis, polymorphisms, ADR β 2, COMT, NADH Dehydrogenase.

INTRODUÇÃO

1. Epidemiologia

A Psoríase é uma doença hereditária, inflamatória crónica mediada por processos imunitários de etiologia desconhecida. A palavra psoríase vem do grego e significa erupção sarenta. A doença afecta 2-3% da população mundial (Ghazizadeh, Shimizu, Tosa, & Ghazizadeh, 2010), sendo que a maioria das pesquisas científicas refere-se à variante clínica comum denominada psoríase vulgar que afecta cerca de 85-90% das pessoas que têm a doença (Nestle, Kaplan, & Barker, 2009). O seu aparecimento pode ocorrer em qualquer idade, no entanto é mais comum aparecer na idade adulta, sendo que não depende do género (Traub & Marshall, 2007). Apesar de a sua etiologia não ser conhecida (Mehta, et al., 2012), sabe-se que a pele Psoriásica está num estado hiperproliferativo com um aumento da taxa de replicação dos queratinócitos (O'Neill, 1994). Sabe-se também que o seu desenvolvimento e/ou exacerbação é resultante da interacção complexa entre muitos factores de risco não só ambientais mas também genéticos. Os factores desencadeantes da doença são infecções, lesões da pele (como um corte ou uma picada de insecto), stress fisiológico (Hall, et al., 2012), baixas temperaturas, hábitos tabágicos, consumo exagerado de álcool e certos medicamentos (que incluam lítio - prescritos para doença bipolar; medicamentos para o controlo da pressão arterial como os betabloqueantes e medicamentos anti maláricos) (Griffiths & Barker, 2007).

Segundo dados recentes, a doença não é apenas cutânea, pois afecta outros sistemas com um fundo inflamatório comum (Griffiths & Barker, 2007). O sistema cardiovascular é muito frequentemente envolvido por via da disfunção endotelial, consequência da obesidade, síndrome metabólico, dislipidémia, tendo como fenótipo distante a aterosclerose e suas consequências orgânicas (Doença Coronária, Acidentes Vascular Cerebral, Doença Vascular Periférica). Estas situações são uma importante causa de morbilidade e mortalidade nos doentes com psoríase. No entanto este assunto continua controverso (Ghazizadeh, Shimizu, Tosa, & Ghazizadeh, 2010).

2. Patogénese

Inicialmente a Psoríase era considerada uma doença de queratinócitos epidérmicos (Traub & Marshall, 2007), no entanto nos dias de hoje é reconhecida como uma doença relacionada com auto-imunidade caracterizada por inflamação crónica na ausência de agentes infecciosos ou auto-anticorpos conhecidos (Nestle, Kaplan, & Barker, 2009), pelo que o

conhecimento geral da patogênese molecular da psoríase atribui central importância na interação entre a imunidade inata e adquirida (Ghazizadeh, Shimizu, Tosa, & Ghazizadeh, 2010). Sabe-se que no início da doença bem como durante as exacerbações nos estádios mais tardios, encontram-se especialmente células dendríticas (CD) activadas tanto na epiderme como na derme (Ammar, et al., 2012). Entre outros efeitos, estas células produzem TNF α e IL-23, moléculas que promovem o desenvolvimento de certas subclasses de células T, como Th1 e Th17, as quais secretam mediadores que vão contribuir para as alterações vasculares e epidérmicas da doença (Ammar, et al., 2012; Nestle, Kaplan, & Barker, 2009; Traub & Marshall, 2007). Esta activação de vias de transdução de sinais intracelulares tem um papel essencial no reforço da reacção imune inflamatória (Ghazizadeh, Shimizu, Tosa, & Ghazizadeh, 2010).

Esta doença apresenta-se hoje como uma doença inflamatória crónica da pele, sendo a tradução de uma hiperproliferação epidérmica resultante de uma anormal interacção entre os linfócitos T e os queratinócitos selando uma dinâmica complexa e incerta. A proliferação dos queratinócitos e a hiperplasia vascular observada nas lesões são consequência de um processo inflamatório sob o controlo essencialmente de linfócitos T, células dendríticas e citocinas proinflamatórias (Ammar, et al., 2012).

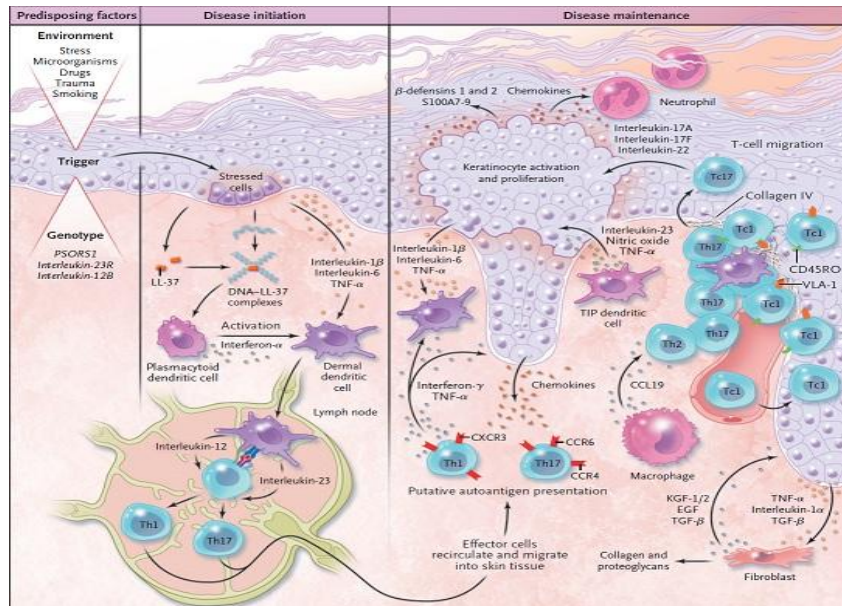


Figura 1 - Esquema da possível hipótese da evolução da lesão Psoriásica desde o seu início até à manutenção da doença (Nestle, Kaplan, & Barker, 2009).

As CDs têm um papel chave no início da doença, encontrando-se em grande número nas lesões Psoriásicas, principalmente as células dendríticas plasmocitóides (pCDs) que foram identificadas como estando possivelmente relacionadas no início das lesões (Nosbaum &

Nicolas, 2009), na medida em que são as principais células produtoras de INF, citocina que desempenha um papel importante no início da Psoríase (Nestle, Kaplan, & Barker, 2009).

Os queratinócitos além de serem uma fonte rica de péptidos antimicrobianos - como beta defensinas e S100A7, que podem ter função quimiotática e assim modular a função de células imunes, como as CDs e os LTs - têm também um possível papel acessório nas respostas imunes da pele, uma vez que respondem a citocinas derivadas de CD e células T (IL17 e IL20), e em resposta secretam citocinas próinflamatórias (IL1 IL6 e TNF α) e quimiocinas (interleucina 8- CXCL8, CXCL10 e CCL20). O transporte de células T da derme para a epiderme é também um dos fenômenos importantes na psoríase, sendo este controlado pela interação da integrina α 1 β 1 (very late antigen 1 - VLA1) nas células T com o colagénio tipo IV na base da membrana da epiderme Psoriásica. As células Th17 libertam IL-17, o que promove a inflamação, uma vez que induz a expressão de moléculas quimioatrativas presentes nas lesões Psoriásicas (Figura 1). Também libertam IL-22 que está envolvida na diferenciação tardia dos queratinócitos levando à proliferação dos mesmos (Fu & Vender, 2011).

3. Genética

Estudos populacionais mostram que a incidência de psoríase vulgar é maior entre parentes de primeiro e segundo grau do que na população em geral, sendo que cerca de 30% dos indivíduos com psoríase vulgar têm um parente de primeiro grau afectado. Por exemplo, caso ambos os pais e um irmão tenham psoríase vulgar, então a probabilidade de um futuro filho vir a desenvolver a doença é cerca de 50%, no entanto se apenas o irmão tiver a doença, o risco cai para os 8%. Já no que respeita aos gémeos o risco é cerca de duas a três vezes maior (Griffiths & Barker, 2007).

Existem pelo menos nove *loci* identificados como tendo evidência de *linkage* com a psoríase. Estes *loci* são designados de PSORS1-9 (Psoriasis Susceptibility 1-9) (Nestle, Kaplan, & Barker, 2009). O maior determinante genético é o PSORS1 que provavelmente é responsável por 35-50% da hereditariedade da doença. PSORS1 está localizado no braço curto do cromossoma 6, na região telomérica, abrangendo um segmento de cerca de 300kb contido na região génica do Complexo de Histocompatibilidade Major (Griffiths & Barker, 2007). Apesar de ser o mais estudado, a penetrância deste *locus* é inferior a 15%, tendo sido demonstrado que existem outros factores genéticos e/ou ambientais que podem contribuir para a susceptibilidade de desenvolvimento da doença (Liu, Krueger, & Bowcock, 2007).

4. Tipos clínicos

Existem vários tipos clínicos desta doença sendo o mais comum o tipo Psoríase vulgar, o qual afecta cerca de 80% dos pacientes. Neste caso os locais mais propícios para o aparecimento das exacerbações são o couro cabeludo (30% no início da doença e cerca de 70% com o avançar desta), na superfície extensora dos cotovelos e joelhos, e na região sagrada (Mrowietz & Reich, 2009).

Outros tipos clínicos são a Psoríase gutata, que é um tipo de psoríase eruptiva aguda, sendo as lesões muito pequenas e numerosas. Normalmente esta forma corresponde ao início da manifestação da doença, após uma infecção Streptocócica. Existe também a psoríase inversa que afecta essencialmente áreas de flexão (Langley, Krueger, & Griffiths, 2005). A psoríase eritrodérmica é uma variante mais rara e envolve toda a pele. Já a psoríase pustulosa também rara, caracteriza-se por pústulas geralmente nas mãos e nos pés, embora possa ocorrer no resto do corpo (Mrowietz & Reich, 2009), sendo que a psoríase pustulosa palmo plantar afecta as palmas das mãos e as plantas dos pés (Langley, Krueger, & Griffiths, 2005).

5. Gravidade clínica da Psoríase

Esta doença pode ser classificada como ligeira, moderada ou grave, sendo que a classificação tem em conta a gravidade das manifestações cutâneas, que normalmente estão relacionadas com o Índice de Área e Gravidade da Psoríase (PASI). Este parâmetro baseia-se no grau de eritema, infiltração, descamação e extensão envolvida nas quatro áreas corporais - cabeça, tronco, braços e pernas. Quando o PASI é inferior a 10 a psoríase é classificada de fraca, e quando PASI é igual ou superior a 10 classifica-se de moderada a grave. O valor máximo é de 72, sendo que valores superiores a 40 são raramente encontrados (Mrowietz & Reich, 2009).

6. Terapêutica

6.1. Terapêutica tópica

Este tipo de tratamento é passível de trazer melhorias em casos de Psoríase ligeira ou moderada. Esta terapia é usualmente utilizada em adição à fototerapia ou à terapia sistémica (Mrowietz & Reich, 2009). A medicação que continua a ser mais utilizada são os corticóides tópicos classe II e II, no entanto os análogos da vitamina D3 (cacipotriol, tacalcitol) começaram a ter um uso mais comum nos últimos anos.

6.2. Fototerapia

É uma terapia utilizada em pacientes com psoríase moderada a grave, ou quando não houve resposta à terapêutica tópica. A aplicação da luz ultravioleta é adequada para induzir a remissão mas não para terapia de manutenção na medida em que o seu uso prolongado está associado com um elevado risco de cancro de pele. A radiação UVA após a administração de um fotossensibilizador (psoralen) por via oral ou em creme (PUVA) é altamente eficaz (Mrowietz & Reich, 2009).

6.3. Terapêutica Sistémica

Este tipo de terapêutica tem um papel principal para pacientes com psoríase moderada a grave. A terapêutica sistémica deve ser sempre aplicada quando os outros tipos de tratamento não resultaram num benefício clínico (critério aplicado a doentes com psoríase grave das unhas ou envolvimento sistémico). O espectro de medicamentos utilizados é alargado, sendo alguns exemplos os ésteres de ácido fumárico, o Metotrexato, Acitretina retinóide e a Ciclosporina (Mrowietz & Reich, 2009).

6.3.1. Terapêutica Biológica

É um tipo de terapêutica sistémica utilizada particularmente para doentes Psoriásicos intolerantes ou não respondedores aos tratamentos sistémicos convencionais (Emerit I, 2011). Neste caso as proteínas recombinantes produzidas biotecnologicamente são utilizadas de forma a compensar o desequilíbrio formado pela inadequada regulação do sistema imune levando a um melhoramento das manifestações clínicas. Exemplos destes são citocinas, proteínas de fusão formadas por moléculas de superfície e a porção conservada de imunoglobulinas (Fc) ou anticorpos (Mrowietz & Reich, 2009).

7. Co morbilidades

As Co morbilidades tendem a aparecer em doenças complexas, sendo frequentemente multigénicas e multifactoriais, apresentando normalmente um fundo inflamatório comum (Christophers, 2006).

Apesar de inicialmente a Psoríase ser vista como uma doença de pele, sendo realçados apenas os sintomas associados a este órgão (Gottlieb & Dann, 2009), alguns estudos demonstram que as co morbilidades cardio-metabólicas da psoríase têm um impacto significativo na saúde do doente, existindo por isso a hipótese de os produtos inflamatórios sintetizados inicialmente na pele puderem ser libertados na circulação sistémica por difusão através do endotélio cutâneo (Suárez-Fariñas, et al., 2012). Apesar de a doença não ter uma

elevada mortalidade, esta pode causar morbidade considerável e ter um impacto profundo na qualidade de vida dos indivíduos (Sanz, 2007). Indivíduos com Psoríase sofrem muitas vezes de doenças associadas, como o caso da Artrite Psoriásica (Raychaudhuri, et al., 2010) Doença cardiovascular (Stern, 2010; Choi, Park, Kwon, Kim, & Kim, 2012; Ghazizadeh, Shimizu, Tosa, & Ghazizadeh, 2010), Síndrome metabólico (Cohen, et al., 2007) ou Doença de Crohn's (Nestle, Kaplan, & Barker, 2009; Gottlieb & Dann, 2009), que aumentam consideravelmente a morbidade e muitas vezes também a mortalidade da doença, o que encurta a esperança de vida.

8. Inflamação e catecolaminas

A presença e síntese de catecolaminas (CAs) nos linfócitos foram descritas há mais de uma década (Flier M. A., et al., 2007). As CAs, que regulam a resposta imune e inflamatória, derivam da medula supra-renal e dos neurónios do sistema nervoso simpático (SNS). Contudo alguns estudos revelaram que as células T também sintetizam e libertam CAs (Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008) capazes depois de modular a proliferação, diferenciação, e apoptose dos próprios linfócitos, assim como a produção de citocinas através dos receptores adrenérgicos nas células T e B (Flier M. A., et al., 2007). Começa-se então a perceber que as CAs são parte integral e constituem potentes moduladores destas redes de interacção do sistema neuro-endócrino-imune/inflamatório. Estas conseguem modular a produção de citocinas das células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) através da comunicação directa via fibras nervosas simpáticas que enervam os órgãos linfóides, sendo tais interacções facilitadas pelos receptores β -adrenérgicos expressos nas PBMCs humanas (Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008).

Existem duas enzimas-chave na síntese de CAs, sendo estas a hidroxilase de tirosina (TH) que é conhecida por ser o passo limitante da velocidade de síntese das catecolaminas, convertendo a tirosina em L-Dopa (L-DOPA), e a dopamina- β -hidroxilase (DBP) que converte a dopamina em norepinefrina ou noradrenalina (Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008). A presença destas enzimas no meio intracelular e a alteração da sua expressão tem implicações na capacidade das células sintetizarem CAs *de novo*. Hoje em dia torna-se claro que os linfócitos e os fagócitos não só têm a capacidade de produzir, armazenar, libertar e reabsorver CAs como essas células são capazes de regular a sua síntese em resposta a vários estímulos extracelulares (Flier M. A., et al., 2007; Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008).

As CAs são também encontradas em todos os neurónios adrenérgicos, mas encontram-se em maior concentração nos terminais neuronais pré-sinápticos periféricos, onde são armazenados em vesículas que se ligam e que se fundem com as membranas por um processo de exocitose sendo protegidas de degradação enzimática. No que se refere aos mecanismos moleculares envolvidos na libertação de CAs por linfócitos estes ainda não estão totalmente esclarecidos (Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008). Após a libertação de epinefrina ou adrenalina e norepinefrina ou noradrenalina, a actividade destas CAs é terminada por três processos. 1. Recaptura para os terminais nervosos; 2. Diluição nos fluidos extracelulares e recaptção nos locais extraneurais; 3. Transformação/inactivação metabólica. Neste último processo existem duas enzimas essenciais para passos iniciais, sendo estas a Monoamina Oxidase (MAO) e a Catecol-O-metiltransferase (COMT). Estas duas enzimas produzem metabolitos de CAs fisiologicamente inactivos (Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008).

Os receptores adrenérgicos são receptores acoplados a proteínas G, com sete ansas transmembranares, sendo que após interacção destes receptores com os seus ligandos, geram mensageiros secundários, como o cAMP, iões Ca^{2+} entre outros, que podem activar e/ou inibir a sua actividade. Portanto as CAs secretadas são capazes de activar ou inibir a própria célula que as secreta assim como de células que se encontram nas suas proximidades de uma maneira autócrina ou parácrina, estimulando receptores adrenérgicos/dopaminérgicos, activando mensageiros intracelulares secundários e em último caso regulando as funções celulares (Flier M. A., et al., 2007).

As CAs são oxidadas intracelularmente pela MAO (associada à membrana externa mitocôndrias) e pela COMT (citoplasmática), sendo que nesse processo originam vários produtos incluindo grande quantidades de espécies reactivas de oxigénio e outros metabolitos citotóxicos conhecidos por induzir a apoptose em linfócitos de rato e em PBMCs humanos (Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008).

9. Redutase Transmembranar dos Eritrócitos

Está demonstrado que os eritrócitos contêm uma NADH oxidorredutase de ligação à membrana capaz de oxidar NADH na presença de aceitadores de electrões não permeantes como são os casos do ferricianeto, do citocromo c e do 2,6-diclorofenolindofenol (Wang, 1980).

A NADH redutase do ferricianeto da membrana celular, também denominada de Redutase Transmembranar é um sistema antioxidante ubíquo, que tem como substrato inorgânico natural o ferro, férrico (Fe^{3+}) da transferrina o qual por redução passa a ferro ferroso (Fe^{2+}) apto para ser capturado pela célula (Silva, 2001). Ainda não está muito esclarecida a estrutura da enzima no entanto sabe-se que é uma glicoproteína transmembranar cujo local catalítico se encontra na superfície interna da membrana (Wang, 1980). A redutase transmembranar transfere electrões do NADH intracelular para oxidantes externos não permeantes como o ferricianeto, através de vias ligadas a processos metabólicos na célula. A redução de ferricianeto a ferrocianeto pelos eritrócitos humanos é estimulada por agonistas do receptor β -adrenérgico, como a adrenalina, ritodrina e isoxuprina, sendo este efeito dependente da concentração dos agonistas e do pH (Marques & Bicho, 1997).

10. Psoríase e Polimorfismos genéticos

10.1. *Receptor beta adrenérgico (ADR β 2)*

O receptor beta adrenérgico é uma proteína com 6 ansas transmembranares acoplado com proteína G. É um receptor endógeno para CAs, e que pode ser classificado em beta 1 (β 1), beta 2 (β 2), beta 3 (β 3), baseado nas diferenças da resposta farmacológica às CAs e antagonistas específicos (Sivamania, Lam, & Isseroff, 2007).

A presença de receptores beta-adrenérgicos na epiderme aparenta estar relacionado com um aumento dos níveis de AMP cíclico (cAMP) nos queratinócitos após estimulação com agonistas não específicos de receptores beta adrenérgicos (Sivamania, Lam, & Isseroff, 2007).

Contudo o aumento dos níveis intracelulares de cAMP nos queratinócitos tal como nos linfócitos só se dá por estimulação de agentes específicos do receptor beta-2-adrenérgico (ADR β 2). Este receptor específico (ADR β 2) traduz os seus sinais intracelulares via cascatas de sinalização acopladas com proteínas G (GTP/GDP binding). Esta transdução de sinal promove um aumento de cAMP mediado pela adenilato ciclase. A activação da via dependente de cAMP por activação indirecta da adenilato ciclase via proteína G tem como consequência um aumento intracelular no cálcio intracelular, como consequência da estimulação do ligando do ADR β 2 (Sivamania, Lam, & Isseroff, 2007). Este receptor é codificado por um gene sem intrões e localizado no cromossoma 5 na posição q31-32. Até à data já foram descritos 12 SNPs para o gene do receptor β -2-adrenérgico, sendo que 5 destes (Arg16Gly, Gln27Glu, Val34Met, Trh164Ile e Ser220Cys) causam substituições nos

aminoácidos (SNPs) e têm um significado funcional (Pereira, Cava, Giro, & Mesquita, 2010). Três destes encontram-se representados na Figura 2.

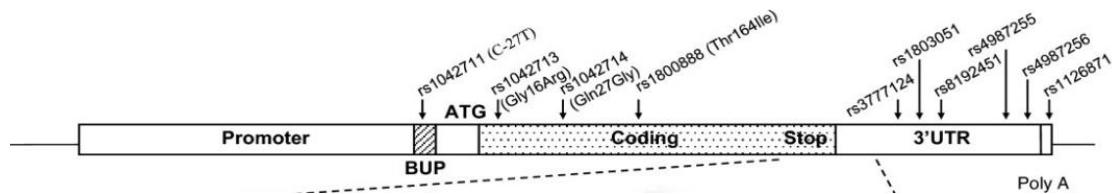


Figura 2 - Representação do gene do receptor β -2-adrenérgico. Neste esquema encontra-se representada a região promotora, o ADBR2 upstream peptide (BUP), o códon de iniciação ATG, a região codificante (picotada), a região 3' não traduzida (3' UTR) e o sinal de poliadenilação. Os SNP's estão representados por (\downarrow), entre os quais se encontram o rs1042713 correspondente à alteração Arg16Gly. (Ambrose, et al., 2012)

No caso do Polimorfismo Arg16Gly ocorre a substituição de uma citosina por uma guanina na posição 46 do gene do receptor β -2 promovendo uma substituição de uma Arginina (Arg) por uma Glicina (Gly) na posição 16, sendo a variante Glicina, a "selvagem", uma vez que foi demonstrando ser a mais frequente (frequência alélica Arg/Gly 0.40/0.60) (Pereira S B, 2010). A frequência alélica varia consoante o grupo étnico, sendo que em populações Afro-americanas a frequência da variante Arg é de 49% enquanto em populações Caucásicas e Asiáticas é de 46% e 59%, respectivamente. Está bem estabelecido que os polimorfismos acima descritos não alteram a capacidade de ligação de CAs ao receptor β -2, no entanto parecem estar relacionados com um fenómeno dessensibilização do ADR β 2 (Pereira, Cava, Giro, & Mesquita, 2010).

10.2. *Catecol-O-metiltransferase (COMT)*

Catecol-O-metiltransferase (COMT) é uma enzima que metaboliza CAs, tem um importante papel no metabolismo de fármacos e neurotransmissores ao transferir um grupo metilo da coenzima S-adenosil-L-Metionina (SAM) para um grupo hidroxilo de cateóis, formando um composto metoxilado, pelo que diminui a formação de catecolquinonas e semiquinonas altamente reactivas que provocam lesões ao nível do DNA ou que são tóxicas para as células (reação com grupos SH₂ e NH₂ de proteínas) (Tanaka, et al., 2006). Esta enzima é codificada por um único gene localizado em 22q11.1-q11.12. A proteína tem duas variantes, uma solúvel S-COMT e outra de ligação à membrana MB-COMT (membrane bound COMT) que contém mais 50 aminoácidos na extremidade N-terminal que a S-COMT (Gao, et al., 2009).

Alguns estudos demonstraram uma possível relação entre esta enzima e a Psoríase, na medida em que esta metaboliza catecolaminas, moléculas relacionadas com a resposta inflamatória, uma das características da doença (Erdal, et al., 2004).

Muitos polimorfismos têm sido identificados no gene COMT e três desses (Figura 3) encontram-se na região codificante: no codão 62 (C>T), no codão 72 (G>T) e no codão 158 (G>A). A variante polimórfica no codão 62 é uma mutação silenciosa (His), enquanto nas outras variantes no codão 72 é alterada uma Alanina por uma Serina, e no codão 158 uma Valina é alterada por uma Metionina (Tanaka, et al., 2006).

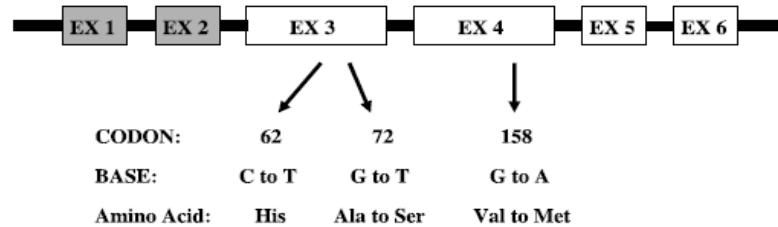


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura do gene da COMT. Encontram-se representados os 6 exões do gene da COMT, em que os dois primeiros não são codificantes. Três locais polimórficos aqui demonstrados estão localizados no codão 62 (C→T), codão 72 (G→T), e codão 158 (G→A). As variantes Polimórficas nos codões 62 e 72 estão localizadas no exão 3 e a do codão 158 está no exão 4 (Tanaka, et al., 2006).

O Polimorfismo melhor estudado neste gene consiste na alteração de um único par de bases (G>A) no quarto exão o que leva a uma alteração de um aminoácido Val>Met no codão 158 da MB-COMT e no codão 108 da S-COMT. Este polimorfismo pontual (SNP) resulta numa redução da termoestabilidade e actividade da enzima (Gao, et al., 2009).

Quando o codão 158 do gene COMT codifica para uma valina é formada a variante da enzima com alta actividade (COMT^H) e estável em altas temperaturas, sendo que quando codifica para uma metionina é formada a variante com baixa actividade (COMT^L) e instável em altas temperaturas (Li, et al., 2009). A variante Metionina é a mais frequente em populações caucasianas, representando cerca de 50% (Worda, et al., 2003). Na população Turca foi observada uma forte relação entre o genótipo AA - variante metionina - e casos de Psoríase (Gao, et al., 2009).

OBJECTIVOS

Neste estudo pretende-se avaliar a associação entre a actividade da redutase transmembranar com a Psoríase, bem como a influência dos genótipos dos polimorfismos da enzima COMT e do receptor beta2 adrenérgico (ADR β 2) no desenvolvimento da doença.

Para atingir os objectivos gerais serão determinadas as frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos de substituição de um nucleótido existentes no codão 16 do ADR β 2 e no codão 158 do gene que codifica para a COMT na população Psoriásica em estudo e comparadas com as frequências na população controlo. A actividade da Redutase Transmembranar foi também comparada entre as duas populações.

Será averiguado quais alelos de ambos os polimorfismos apresentam um maior risco associado à doença.

Será também averiguada a existência de uma relação entre os genótipos dos genes COMT e ADR β 2 e a actividade da Redutase transmembranar na Psoríase. Por fim averiguar-se-á igualmente uma possível correlação entre o PASI e os genótipos do polimorfismo Val158Met do gene da COMT e do polimorfismo Arg16Gly do gene ADR β 2, bem como a actividade da RTM.

METODOLOGIA

1. Descrição da População

Neste trabalho foram utilizadas 50 amostras de sangue de indivíduos Psoriásicos, que consentiram a sua dádiva para este estudo, seguidos no serviço de Dermatologia do Hospital de Santa Maria - Centro Hospitalar Lisboa Norte, pelo Prof. Doutor. Paulo Filipe e pela Dra. Joana Antunes.

Como grupo controlo foram utilizados os dados relativos a 311 indivíduos da população cedida pelo Professor Doutor Mário Rui Mascarenhas que não apresenta doença. Deste universo foram utilizados dois conjuntos, um com 80 indivíduos como grupo de controlo para a actividade da RTM e outro com 260 indivíduos como grupo de controlo para a análise dos polimorfismos em estudo. Deste último foram genotipados 218 indivíduos para o gene da COMT e 42 para o gene do ADR β 2.

Para os efeitos deste estudo considera-se indivíduos doentes todos os que têm psoríase vulgar. Os restantes consideram-se controlos independentemente de patologias associadas.

2. Extracção de DNA

A extracção de DNA foi realizada pelo método de *salting out* adaptado do método de (Lahiri & Nurnberger Jr., Nucleic Acid Research) (Anexo II).

3. Quantificação de DNA

A quantificação (ng/ μ L) e a determinação da pureza (razão entre absorvências 260/280 e 230/260) do DNA extraído foi realizada num espectrofotómetro de espectro completo (NanoDrop[®] ND-10000).

4. Amplificação de DNA

A amplificação do DNA foi conseguida recorrendo à técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que consiste numa reacção cíclica de alternância de temperatura, que permite a desnaturação da cadeia de DNA, o emparelhamento dos *primers* (*annealing*) e em seguida a síntese de novas cadeias de DNA. A amplificação dos genes em estudo foi efectuada num

termociclador GeneAmp PCR System 2700 com diferentes condições como descrito no Quadro 1.

Em todas as reacções foi efectuado *Hotstart* a 94°C durante 2min e ao fim dos 35 ciclos ocorreu a extensão final a 72°C durante 5min.

Quadro 1 - Primers e condições do PCR-RFLP

Gene	Primers	Condições PCR	Componentes	Fragmento Amplificado
COMT	5'-GGCTCATCACCATCGAGATCAA-3'	35 ciclos Desnaturação: 45s a 94°C Annealing: 45s a 60°C Extensão: 1min a 72°C	DNA: 200ng Primer p1: 10 pmol Primer p2: 10 pmol Taq: 1U MgCl: 25mM PCR nucleotide mix: 0.2mM Volume final: 50µL	111bp
	5'-CCAGGTCTTGACAACGGGTCA-3'			
ADRB2	5'-CCTTCTTGCTGGCACCCCAT-3'	35 ciclos Desnaturação: 30s a 94°C Annealing: 30s a 63,6°C Extensão: 45s a 72°C	DNA: 200ng Primer p1: 10 pmol Primer p2: 10 pmol Taq: 1U MgCl: 25mM PCR nucleotide mix: 0.2mM Volume final: 25µL	308bp
	5'-GGAAGTCCAAAACCTCGCACCA-3'			

A confirmação da amplificação dos 2 fragmentos foi efectuada por electroforese em gel de agarose (Fermentas topVision™ Agarose) a 2% feito em TAE (200 mM Tris-Acetato, 10 mM EDTA, pH 8) e brometo de etídio (10 mg/mL). A electroforese foi efectuada durante 35 min a 85 V.

5. Genótipagem dos indivíduos

A genótipagem dos dois polimorfismos foi estudada recorrendo à técnica de RFLP (*Restriction Frangment Length Polymorphism*), que permite discriminar os 2 alelos através da electroforese em gel de agarose dos produtos de restrição enzimática. A restrição é efectuada no termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp® PCR System 2700), nas condições descritas no Quadro 2. O gel de agarose a 4% (Fermentas, topVision™ Agarose) foi feito com TAE (200mM Tris-Acetato, 10mM EDTA, pH 8) e Brometo de etídeo (10mg/mL) e a electroforese foi efectuada a 85 V durante 85 min para ambos os polimorfismos.

Quadro 2 - Metodologia usada e fragmentos de restrição possíveis de obter no estudo dos polimorfismos do gene COMT e ADR β 2 através da técnica de RFLP

Gene	Polimorfismo	Componentes (Thermo Scientific®)	Condições da restrição	Genótipo possível
ADRB2	Arg16Gly	Produto de PCR: 8.5 μ L		AA- 308 pb
		Enzima: NcoI (1 μ L)	37°C 5 min	AG-308+291+17 pb
		Tampão: green buffer (2 μ L)	65°C 15 min	GG- 291+17 pb
		Volume final: 30 μ L		
COMT	Val158Met	Produto de PCR: 10 μ L		GG- 89+22 pb
		Enzima: NlaIII (1 μ L)	37°C 5 min	GA- 89+71+22+18 pb
		Tampão: green buffer (2 μ L)	65°C 10 min	AA-71+22+18 pb
		Volume final: 30 μ L		

A visualização dos produtos de amplificação e restrição foi efectuada num transiluminador de ultravioleta (GenoSmart VWR[®]).

6. Actividade da Redutase Transmembranar Eritrocitária

Para determinar a actividade da enzima redutase transmembranar, presente nos eritrócitos, separaram-se os eritrócitos do sangue total colhido através de 4 centrifugações a 2000 rpm (centrifuga Sigma Laborzentrifugen 3k15) durante 10 min, sendo a primeira para separar o plasma dos restantes componentes do sangue, e as restantes lavagens com NaCl 0.9% (v/v) para se ficar apenas com os eritrócitos. De seguida procedeu-se ao protocolo "Actividade da Redutase Transmembranar" (adaptado de Marque & Bicho,1997) (anexo III) que promove a conversão de Ferricianeto em Ferrocianeto pela RTM da membrana dos eritrócitos.

7. Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi efectuada no software IBM SPSS Statistics 20 bem como no Primer of biostatistics (Glantz, 2002), estabelecendo-se o nível de significância de $p < 0.05$.

Para grupos de dados contínuos, como é o caso da actividade da redutase transmembranar, realizou-se testes de normalidade para as populações controlo e doentes, e procedeu-se a um T-teste para avaliar as diferenças entre as populações.

Foram utilizados os indivíduos controlo com Índice de Massa corporal (IMC) ≤ 25 , e no caso dos doentes foram avaliadas as possíveis diferenças na distribuição da actividade da RTM entre obesos e não obesos.

Para verificar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os génotipos tanto dos controlos como doentes, bem como na comparação das duas populações, foi utilizado o Teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson visto se tratarem de dados discretos.

De modo a avaliar a relação entre os génotipos polimórficos e a actividade da redutase transmembranar para a população controlo e doentes, no caso de as variáveis apresentarem uma distribuição normal procedeu-se a uma análise paramétrica ANOVA no caso estarem representados todos os génotipos, se tal não suceder utiliza-se um teste t-Student. No caso contrario utilizam-se testes não-paramétricos respectivamente Kruskal Wallis e Mann Whitney U.

Para averiguar a relação entre o PASI e os polimorfismo bem como com a actividade da RTM, foram efectuados testes paramétricos como ANOVAS / t-Student's, e correlação de Serman, respectivamente.

RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo provêm dos 50 doentes psoriásicos e dos 311 indivíduos controlo.

Dos 50 doentes Psoriásicos foram obtidas as actividades da Redutase Transmembranar para os referidos indivíduos. Destes foram genotipados 42 para o polimorfismo Arg16Gly do gene ADR β 2 e 41 para o polimorfismo Val158Met do gene da COMT.

1. Análise Descritiva da população

A população total relativamente à característica idade apresenta 360 indivíduos, tendo como média de Idades 54.6 ± 13.61 anos. Dentro desta população existem 311 controlos, cuja média de idades é de 53.8 ± 13.77 anos e 49 Indivíduos doentes com média de idades de 52.3 ± 12.89 anos (Quadro 3).

Relativamente à característica género, no total existem 349 indivíduos, dos quais 250 são Mulheres e 99 são Homens. Destes 349, 299 são controlos, dos quais 235 são Mulheres e 64 são Homens, enquanto 50 são doentes, dos quais 15 são Mulheres e 35 são Homens (Quadro 4).

Observa-se então que relativamente à característica Idade a média da população controlo e doente não varia muito, no entanto no que respeita a característica Género é de notar que a população doente tem mais homens que mulheres, ocorrendo o oposto na população controlo.

Quadro 3 - Análise descritiva da característica idade da população em estudo.

	População total (controlos + doentes)		População controlo		População doente	
	N (%)	Média $\pm\sigma$ *	N (%)	Média $\pm\sigma$ *	N(%)	Média $\pm \sigma$ *
Idade	360	54.616 ± 13.648	311	53.824 ± 13.778	49	52.347 ± 12.893

* A característica idade está representada por Média \pm Desvio padrão.

Quadro 4- Análise descritiva da característica Género da população em estudo.

	Género		
	Total	F	M
População total (controlos + doentes)	349	250 (71.6%)	99 (28.4%)
População controlo	299	235 (78,6%)	64 (21,4%)
População doente	50	15 (30%)	35 (70%)

2. Redutase transmembranar do ferricianeto dependente de NADH

Inicialmente estudou-se a normalidade da variável Actividade da Redutase Transmembranar (RTM) para a população Total (controlo + doente). Observou-se então que a variável RTM apresenta uma distribuição normal ($p > 0.05$). Desta forma efectuou-se uma análise descritiva de modo a saber a média assim como o máximo e mínimo da actividade da RTM para as populações controlo e doente. Observou-se que parte da população usada como controlo para a análise da actividade da RTM (80 indivíduos) tem como média de actividades da RTM 5.771 ± 2.637 mmol/Lcél/h. No caso da população de indivíduos doentes (50 indivíduos) observou-se que esta tem como média de actividades da RTM 2.083 ± 1.145 mmol/Lcél/h (Quadro 5).

Quadro 5 - Actividade da redutase transmembranar do ferricianeto eritrocitária dependente de NADH no grupo controlo e no grupo de doentes Psoriásicos.

	Grupo	N	Média $\pm \sigma^*$	Máximo	Mínimo	p-value ^a	Média $\pm \sigma^b$	p-value ^b
RTM	Controlos	80	5.771 ± 2.637	19.22	1.81	0.000	5.73 ± 0.262	0.000
	Doentes	50	2.083 ± 1.145	7.03	0.27		2.162 ± 0.347	

* Valores apresentados em Média \pm Desvio Padrão

^a Significância do Teste de T-Student

^b Modelo ajustado tendo em conta a idade e o género

Visto que a População de doentes contem indivíduos com excesso de peso e obesidade, verificou-se se havia diferenças na média da actividade da RTM entre os indivíduos obesos e não obesos, efectuando-se para tal um teste t-Student, dada a normalidade da população. Observou-se então que não existem diferenças estatisticamente significativas nas médias dos valores da actividade da RTM ($p = 0.614$), pelo que se utilizou a população doente total para a análise comparativa com a população controlo. Dada a Obesidade ser uma patologia com carácter inflamatório, efectuou-se esta análise para excluir a possível interferência desta patologia nos resultados obtidos

Para fazer a comparação entre as médias da actividade da RTM entre as populações controlo e doente, e perceber se existem diferenças significativas entre estas, efectuou-se um teste paramétrico - t-Student.

Os resultados obtidos demonstram que as populações apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p=0.000$), sendo a média da actividade da RTM no grupo de doentes psoriásicos menor que no grupo controlo. Efectuou-se a análise comparativa das duas populações para o parâmetro actividade da RTM ajustando à idade e ao género. Observou-se que não existem diferenças significativas entre indivíduos controlo e indivíduos doentes no que respeita à idade ($p=0.685$) e ao género ($p=0.575$), e que a média da actividade da RTM é de 5.730 ± 0.262 mmol/Lcél/h na população controlo e 2.162 ± 0.347 mmol/Lcél/h na população psoriásica, existindo diferenças significativas entre as duas populações no que respeita às médias de actividade da RTM (Quadro 5).

3. Análise do polimorfismo ADR β 2

No que respeita à genótipagem relativa ao polimorfismo Arg16Gly (A>G) do receptor β 2-adrenérgico (ADR β 2), observou-se que no grupo controlo as frequências dos genótipos Arg/Arg; Arg/Gly e Gly/Gly foram, respectivamente 55.0%; 45.0% e 0%. A análise do *qui* quadrado (χ^2) foi efectuada para se perceber se a população se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que para este polimorfismo as frequências genotípicas se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2= 3.371$ e $p = 0.185$).

Neste polimorfismo a frequência observada de psoriásicos homozigóticos para a variante Arginina foi de 40.5%; a frequência de Heterozigóticos foi de 42.9%, sendo a frequência dos homozigóticos para a variante Glicina 16.6%. (Quadro 6). Esta população relativamente a este polimorfismo encontra-se igualmente em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2= 0.350$ e $p = 0.839$).

Relativamente às frequências alélicas observou-se que a variante Arginina é a mais comum em ambas as populações, sendo de 61.9% na população doente e de 77.5% na população controlo (Quadro 6), apesar de se observar uma tendência para diferenças entre os valores destas entre as duas populações ($\chi^2=3.370$, $p=0.066$), com um aumento da frequência do alelo Gly nos doentes.

Realizou-se o teste *qui* quadrado (χ^2) comparando as duas populações (controle e doentes), e observou-se que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre elas ($\chi^2= 1.199$ e $p = 0.273$).

Quadro 6 - Frequências genotípica e alélica do polimorfismo Arg16Gly do gene ADR β 2 nos indivíduos controle e doentes.

	Total N	ArgArg	ArgGly	GlyGly	p ^a	Alelo Arg	Alelo Gly	p ^b
		N (%)	N(%)	N(%)		N (frequência)	N (frequência)	
Controlos	42	22 (52.4%)	20 (47.6 %)	0 (0%)	0.273	64 (0.775)	20 (0.225)	0.066
Doentes	42	17 (40.5%)	18(42.9%)	7(16.6 %)		52(0.619)	32(0.381)	

^a valor da significância do teste χ^2 para os genótipos; nível de significância de 0.05

^b valor da significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0.05

Com o intuito de se perceber se algum dos alelos pode exercer um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento da doença psoriática, foi efectuada a análise do Odds Ratio que demonstra uma tendência no sentido do alelo Gly16 poder constituir um factor de risco para a doença (OR = 1.669; IC (95%) =1.010-3.840; p=0.066) (Quadro 7).

Quadro 7 - Risco relativo para a associação entre os alelos do receptor ADR β 2 e a psoríase

	Controlo (%)	Doentes (%)	OR	IC (95%)	P*
ADR β 2 (Arg)	64 (77.5%)	52 (61.9%)	1		
ADR β 2 (Gly)	20 (22.5%)	32(38.1%)	1.969	1.010-3.840	0.066

* Nível de significância 0.05

4. Análise do polimorfismo COMT

Quanto à genótipagem do gene COMT observou-se que no grupo controle as frequências genotípicas são respectivamente 20.2% GG e 68.3% GA e 11.5% AA. Foi efectuada o teste do *qui* quadrado (χ^2) de modo se perceber se a população se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi observado que para esta população, tal não acontece ($\chi^2=31.0$ e $p \leq 0.05$).

Neste polimorfismo a frequência observada de psoriásicos homocigóticos para a variante Valina foi de 34.2%; para os heterocigóticos foi de 58.5% e para os homocigóticos para a variante Metionina foi de 7.3% (Quadro 8). Na população em estudo este polimorfismo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinbeg ($\chi^2= 2.804$ e $p = 0.246$).

Foi ainda realizado o teste *qui* quadrado (χ^2) comparando as duas populações (controle e doentes) observando-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre elas

($\chi^2 = 3.110$ e $p = 0.078$), aparentando no entanto haver uma tendência para uma maior frequência do alelo G na população psoriásica, apesar de a variante valina ser a mais comum em ambas as populações (Quadro 8).

Quadro 8 - Frequências genotípica e alélica do polimorfismo Val158Met do gene COMT nos indivíduos Psoriásicos e controlos

Total	COMT HH	COMT HL	COMT LL	p^a	Alelo H	Alelo L	p^b	
	(ValVal)	(ValMet)	(MetMet)		(Val)	(Met)		
N	N (%)	N (%)	N (%)		N (frequência)	N (frequência)		
Controlos	218	44 (20.2%)	149(68.3%)	25 (11.5%)	0.078	237(0.544)	199(0.456)	0.164
Doentes	41	14 (34.2%)	24(58.5%)	3(7.3%)		52(0.634)	30(0.366)	

^a Significância do teste χ^2 dos genótipos, nível de significância de 0.05

^b Significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0.05

Com o intuito de se perceber se algum dos alelos pode exercer um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento da doença, foi efectuada a análise do Odds Ratio, não tendo sido observada significância estatística (OR=1.455; IC (95%) = 0.894-2.369; $p=0.164$) (Anexo I Quadro 10).

5. Relação entre Polimorfismos e Actividade da RTM

De modo a avaliar possíveis associações entre a actividade da enzima RTM e os genótipos estudados, da COMT e do ADR β 2, foram efectuadas teste de ANOVA no caso do estudo da população doente, já no caso da população controlo foi efectuado o teste de Mann Whitney U e Kruskal-Wallis.

Os resultados obtidos indicam que não existe significância estatística na comparação da distribuição dos valores da actividade da RTM pelos genótipos dos polimorfismos da COMT e do ADR β 2 ($p=0.286$ e $p=0.277$, respectivamente).

Neste caso a análise efectuada foi - teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e Mann Whitney U - sendo que também não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para a actividade da RTM comparado com os génotipos dos polimorfismos da COMT e do ADR β 2 (N=82, $p= 0.469$ e N=14, $p= 0.259$, respectivamente) (Anexo I Quadro 11 Quadro 12).

No caso da população doente, efectuou-se uma ANOVA para cada polimorfismo, não tendo sido também detectadas diferenças significativas (N=41, $p=0.732$ e N= 42, $p=0.646$, respectivamente para COMT e ADR β 2) (Anexo I Quadro 11 Quadro 12).

Comparou-se a distribuição das médias da actividade da RTM e a distribuição de cada genótipo fazendo uma comparação controlo versus doente. Para tal efectuou-se uma análise não paramétrica de Mann Whitney U verificando-se que para a COMT existem diferenças estatisticamente significativas no que respeita à comparação entre as duas populações do genótipo GG e GA ($p=0.000$ para ambos, $p=0.295$ para o AA) (Anexo I Quadro 13). Também no caso do polimorfismo ADR β 2 são encontradas diferenças estatisticamente significativas nos genótipos AA e AG ($p=0.001$ e $p=0.000$, respectivamente) (Anexo I Quadro 14). No caso do genótipo GG a comparação não foi possível uma vez que não existem indivíduos controlo com esse genótipo (Anexo I Quadro 14).

6. PASI e os Parâmetros em estudo

Foi ainda efectuada a análise que compara os três parâmetros em estudo neste trabalho (polimorfismos da COMT; ADR β 2 e RTM) com o Índice de Área e Gravidade da Psoríase (PASI).

A análise da comparação dos genótipos da COMT e do ADR β 2 foi efectuada através de uma ANOVA, observando-se que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p=0.732$ e $p=0.709$, respectivamente). No entanto é de notar que no caso da COMT existe uma tendência para uma diferença nos valores do PASI entre os indivíduos COMT^{HH} e COMT^{HL} (Sig.=0.223) (Quadro 9). Desta forma é possível observar que quando se analisa através do modelo recessivo, efectuando para o efeito um teste t-Student, não existem diferenças estatisticamente significativas ($p=0.062$ e $p=0.423$, respectivamente COMT e ADR β 2) (Quadro 9), apesar da tendência apontada para menores valores de PASI em indivíduos com o alelo A.

No que respeita à relação entre este índice e a actividade da RTM, esta foi averiguada recorrendo a uma correlação de Spearman, observando-se que existe uma correlação inversa (Figura 4), quanto menor a actividade da RTM maior o PASI (ρ spearman= -0.225 e Sig=0.119).

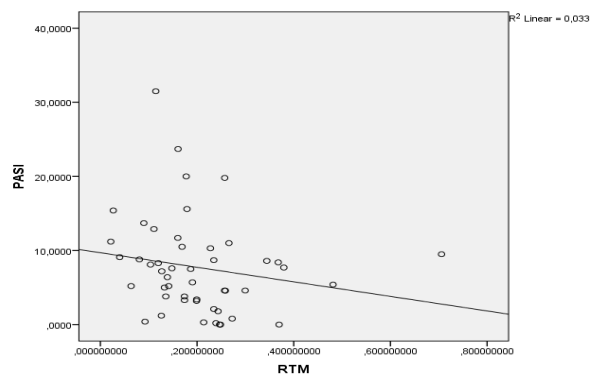


Figura 4 - Gráfico representativo da relação entre a actividade da redutase transmembranar e o PASI.

Quadro 9 - Estatística associativa entre os polimorfismos e actividade da Redutase transmembranar com o PASI

	PASI	N	Média	σ	Erro da Média σ	Mínimo	Máximo	p
COMT	GG	14	9.406	8.293	2.216	.200	31.500	
	GA	23	5.665	4.439	.925	.000	15.600	0.732 ^a
	AA	3	5.333	1.901	1.097	3.400	7.200	
	GA+AA	26	5.627	4.110	0.824	.000	15.600	0.062 ^b
ADR β 2	AA	17	6.511	7.412	1.798	.000	31.500	
	AG	18	8.328	6.172	1.455	.000	20.000	0.709 ^a
	GG	7	7.657	4.253	1.607	3.200	15.400	
	AG+GG	25	8.140	5.621	1.124	.000	20.000	0.423 ^b
	PASI	N	rho sperman	Sig.				
RTM		49	-0.225	0.119				

^a Significância da ANOVA, nível de significância 0.05

^b Significância do teste T-student no modelo recessivo, nível de significância 0.05

DISCUSSÃO

A Psoríase é uma doença crónica que se caracteriza por uma hiperproliferação dos queratinócitos, até dez vezes superior ao normal, mediada por processos imunológicos. O desenvolvimento desta doença ocorre pela interação complexa entre vários factores ambientais e genéticos (Ghazizadeh, Shimizu, Tosa, & Ghazizadeh, 2010). Como tal, começaram-se a estudar alguns genes provavelmente envolvidos no desenvolvimento da doença, como é o caso de variantes ao nível do complexo de histocompatibilidade (MHC) (Henseler, 1997; Stolk, et al., 2006), genes de citocinas como TNF- α (Holer, et al., 1997) e IL-23 (Erin, Erin, Iliyana, Stephen, & Andrew, 2007).

No entanto também outros genes despertaram interesse, principalmente os que se encontram relacionados com o processo inflamatório. É o caso do gene da COMT, já associado a várias doenças como a esquizofrenia (Dias & Rodrigues, 2010), osteoporose (Worda, et al., 2003), cancro da mama (Qin, et al., 2012) e fibromialgia (Vargas-Alarcón, et al., 2007), bem como do gene que codifica o receptor adrenérgico β 2 já associado a doenças como a asma (Ligget, 2000), hipertensão arterial (Kato, et al., 2001) e fibrose quística (Marson, Bertuzzo, Ribeiro, & Ribeiro, 2012). Estes dois genes parecem estar também associados à psoríase (Sivamani, Lam, & Isseroff, 2007; Gao, et al., 2009).

Receptor adrenérgico β 2 (ADRB2)

Os receptores adrenérgicos encontram-se também associados ao processo inflamatório uma vez que se encontram presentes nas membranas dos linfócitos e, por reconhecimento de sinais como as CAs desencadeiam uma cascata de sinalização (Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008), que em último caso promove a libertação de citocinas que vão integrar o processo inflamatório característico do desenvolvimento das lesões psoriásicas (Nestle, Kaplan, & Barker, 2009).

Dado que os receptores adrenérgicos são os transdutores da mensagem das CAs via uma cascata de sinalização acoplada a proteínas G, que classicamente inclui um aumento do AMP cíclico (cAMP) produzido pela adenilato ciclase (AC), e o aumento do cAMP intracelular dos queratinócitos após estímulo pelas catecolaminas provocar uma diminuição na proliferação destas células, pensa-se que a menor capacidade dos receptores responderem a agonistas (Steinkraus, et al., 1993) com um aumento do cAMP intracelular poderá ser, em parte, responsável pelo aumento da proliferação celular característica da doença (Sivamani, Lam, & Isseroff, 2007). Desta forma, e tendo sido demonstrado que a produção de cAMP não é alterada por outros agonistas acoplados à AC, com a histamina, sugere-se que o defeito na

epiderme psoriática reside na via do receptor beta adrenérgico (Sivamani, Lam, & Isseroff, 2007).

Existem vários estudos que relacionam alterações polimórficas do receptor adrenérgico $\beta 2$ com o desenvolvimento de doenças inflamatórias, especialmente no caso da asma (Johnson, 2001; McKusick, 1986), no entanto os polimorfismos deste receptor parecem estar também associados à psoríase como demonstrou Ozkur *et al.* em 2004.

Sivamani *et al.*, descreve uma maior frequência do alelo arginina16 (Arg16) do polimorfismo Arg16Gly no seu grupo de psoriásicos comparando com o grupo controlo.

No presente estudo efectuado as conclusões retiradas são idênticas às apresentadas por Ozkur *et al.*, na medida em que no grupo controlo existe uma maior frequência do alelo que codifica para a Arg que no grupo em estudo, no entanto comparativamente com os controlos a frequência da variante Glicina nos doentes encontra-se aumentada.

Sabe-se que os genótipos deste polimorfismo codificam para um receptor que é mais ou menos expresso na membrana celular, pelo que os indivíduos que possuem o alelo Arg16 apresentam uma maior densidade do receptor que os indivíduos com o alelo Gly16 (Snyder, Hulsebus, Turner, Joyner, & Johnson, 2006; Hesse, et al., 2010).

No entanto no presente estudo, foi demonstrada, ao contrário de Sivamani *et al.* em 2007, uma possível tendência para que o alelo Gly seja um factor de risco para o desenvolvimento da psoríase.

Outro polimorfismo deste receptor muito estudado é o Gln27Glu (Pereira, Cava, Giro, & Mesquita, 2010), sabe-se que a variante Glu27 promove uma alteração da conformação do receptor e apresenta uma maior resistência ao fenómeno de dessensibilização. Desta forma seria interessante estudar a variação genótipica deste polimorfismo para se perceber se terá alguma influência no desenvolvimento da psoríase. Seria também interessante fazer análise de haplótipos, dado que a conjugação de diferentes genótipos dos vários polimorfismos do receptor poderá indicar uma maior importância no desenvolvimento da patologia do que o estudo de apenas um deles.

Catecol-O-Metiltransferase (COMT)

A Catechol-O-Metiltransferase (COMT) encontra-se presente em vários tecidos dos organismos, entre os quais os queratinócitos, estando envolvida na metabolização de CAs como a dopamina, norepinefrina e epinefrina (Malhotra, et al., 2002). As Cas, envolvidas no processo inflamatório, são produzidas pela medula da supra-renal, pelos queratinócitos e por células imunitárias (ex. células T), tendo como função a modulação da proliferação e

diferenciação de linfócitos bem como a produção de citocinas através de receptores adrenérgicos presentes nas células T e B (Flier A. M., Rittirsch, Huber-Lang, Sarma, & Ward, 2008). Esta enzima parece ser importante no estudo da psoríase, na medida em que a fisiopatologia da doença está associada a uma interacção entre o sistema imunitário (inato e adaptativo) por libertação de moléculas imunologicamente activas e as correspondentes interacções destas com células da epiderme e queratinócitos.

Comparando as frequências obtidas neste estudo com estudos semelhantes, verifica-se que no que respeita às frequências genóticas da população controlo estas são idênticas às apresentadas por Ladeiro *et al.* em 2009 numa população Portuguesa, sendo elas respectivamente 26.2% GG; 57.4% GA e 16.4% AA.

No caso de uma população chinesa com psoríase a distribuição das frequências GG GA e AA são respectivamente 56.1%; 38.4%; 5.5% não havendo diferenças estatísticas ao serem comparadas com as do grupo controlo (Gao, et al., 2009). É de notar então que os valores obtidos por Gao *et al.*, para os grupos de controlo e de doentes, são díspares dos observados neste estudo. Isto deve-se ao facto de neste estudo a frequência de GA+AA ser superior à de GG, o contrário do que acontece no estudo apresentado de Gao *et al.* No entanto, comparando os dois grupos do presente estudo observa-se que, tal como no estudo de Gao *et al.*, não existem diferenças estatisticamente significativas, apesar de haver uma tendência para um aumento de GG na população em estudo em comparação com a população controlo dado o $p=0.078$ (tabela 4).

Um dos objectivos foi determinar se o polimorfismo de substituição Val185Met, no exão 4 do gene que codifica para a enzima COMT, está associado com a susceptibilidade de desenvolvimento da Psoríase.

Suspeita-se que a variante COMT^{HH}, ou seja a variante valina que codifica uma proteína com maior actividade que a variante COMT^{LL}, poderá estar relacionado com o desenvolvimento da doença devido a esta maior actividade que irá degradar as CAs. No entanto Erdal *et al.* em 2004, afirma ter encontrado, no seu estudo, uma associação entre a variante COMT^{LL} e a psoríase vulgar.

Uma vez que não se obteve uma diferença significativa na distribuição dos genótipos entre a população em estudo e a controlo, e apesar do valor demonstrar uma certa tendência, a análise do risco sugere que existe uma tendência para risco associado à variante valina ou seja COMT^H e a doença. Desta forma o estudo não demonstra uma relação entre o polimorfismo Val158Met do gene da COMT e a psoríase, contudo, dada a população em estudo ter apenas

42 indivíduos genótipados para este polimorfismo as possíveis conclusões a ser retiradas terão de ser confirmadas aumentando a amostragem. Os resultados apresentados por Gao *et al.* não vão de encontro aos obtidos neste estudo, na medida em que não encontraram qualquer significância estatística entre o polimorfismo e a psoríase na população Han chinesa. Uma possível explicação para as diferenças obtidas entre este estudo e o de Gao *et al.* em 2009 e com o efectuado por Erdal *et al.* em 2004, poderá dever-se às diferentes etnias em estudo (Portuguesa, Han Chinesa e Turca, respectivamente), questão também levantada por Gao *et al.* em 2009, que sugere que sejam efectuados mais estudos em diferentes populações de modo a perceber se existem populações em que o alelo Valina apresenta um risco associado à Psoríase.

Redutase Transmembranar do Ferricianeto dependente de NADH

A redutase transmembranar é uma enzima que se encontra presente na membrana dos eritrócitos.

No estudo publicado por Marques *et al.* em 1997 é demonstrada uma relação entre a actividade desta enzima e a ligação de β -agonistas aos receptores β_2 -adrenérgicos do eritrócito humano, na medida em sugerem que a ligação de agonistas aos receptores presentes no eritrócito humano modificam a actividade redox da enzima.

Como se sabe o receptor adrenérgico β_2 aparenta estar relacionado com o desenvolvimento da psoríase, na medida em que traduz sinais via percepção de moléculas como é o caso de CAs. Como estas aminas biogénicas estão estritamente relacionadas com o processo inflamatório, nomeadamente sendo encontradas elevadas concentrações destas aminas em lesões psoriásicas, pensa-se então que a RTM poderá reflectir o papel dos mecanismos dependentes dos receptores β -adrenérgicos mesmo ao nível sistémico no desenvolvimento da psoríase.

Neste estudo observou-se uma diferença estatisticamente significativa das médias da actividade da enzima entre a população controlo e a doente, sendo este valor menor para o grupo em estudo. Desta forma parece então existir uma associação entre actividade da RTM e a psoríase. Da Silva *et al.* em 2006 assume que tais diferenças se podem dever ao facto de haver um envelhecimento e maior morte celular, o que vai provocar uma diminuição da actividade da enzima.

Dado que a RTM parece estar associada a uma regulação por modulação dos receptores adrenérgicos β_2 (estimulado por CA), e estando a COMT relacionada com o processo, na medida em que a sua função é a degradação de CA, parece importante avaliar as

possíveis associações entre os genótipos dos polimorfismos estudados e a actividade da enzima.

Observou-se então que não existe qualquer relação estatisticamente significativa entre um genótipo específico quer do polimorfismo do ADR β 2 quer do COMT e a actividade da RTM tanto na população controlo como na população de Psoriásicos, como se pode observar pelos valores de significância descritos no (Anexo I Quadro 11, Quadro 12).

Contudo foi possível observar diferenças significativas entre a distribuição da média de actividade da RTM pelos genótipos GG e GA da COMT, correspondentes à COMT^{HH} e COMT^{HL}, o mesmo ocorre com os genótipos do ADR β 2, sendo o mais significativo o genótipo AG, sugerindo que existe uma maior degradação de catecolaminas pela variante COMT^{HH} bem como uma maior dessensibilização dos receptores β 2 e uma menor actividade da RTM associadas à psoríase.

No entanto, recorre o problema da amostragem utilizada na análise ser pequena, sendo assim necessário aumentar a amostragem de forma a se conseguir ter dados mais representativos.

PASI e os Parâmetros estudados

Na medida em que o PASI é o Índice de Área e Gravidade da Psoríase, é através dele que a doença é classificada em duas classes, psoríase ligeira e psoríase moderada a severa, dependendo do valor calculado. Desta forma foram estudadas as possíveis correlações entre o PASI e os Parâmetros em estudo.

No que respeita a actividade da RTM, que indica uma possível relação entre a psoríase e níveis baixos da actividade da enzima, estudou-se a correlação entre o PASI e a sua actividade, tendo-se observado que quanto menor a actividade da enzima mais elevado é o PASI. Comparando os resultados obtidos neste estudo relativamente à RTM e PASI, torna-se claro que existe uma relação inversa entre os dois parâmetros, em que os valores do PASI são superiores para os indivíduos com uma menor actividade da RTM.

No que respeita a comparação deste índice com os genótipos e ambos os polimorfismos em estudo, nenhuma associação foi encontrada, apesar de no caso do polimorfismo do gene da COMT apresentar uma possível tendência para valores de PASI inferiores nos indivíduos portadores do alelo A. Assumindo que neste estudo os resultados apontam para um ligeiro aumento da frequência dos indivíduos doentes portadores do alelo G, o que coloca a hipótese de que este alelo poderá estar associado ao desenvolvimento da doença, e desta forma tais resultados são corroborados pela ligeira tendência apontada pela

relação entre este genótipo e o PASI, em que o valor deste último é em média superior nos indivíduos com o genótipo GG.

Sabe-se que a noradrenalina (NA) é convertida a adrenalina (AD) pela fenilamina-N-metiltransferase (FNMT), e que a COMT metaboliza CAs, como é o caso da adrenalina. Desta forma é possível que no caso dos psoriásicos, haja uma menor concentração de AD, seja pela menor conversão de NA em AD, ou mesmo por uma maior actividade da COMT, como indica a tendência de uma maior incidência do fenótipo COMT^{HH} (variante com actividade mais elevada) nos indivíduos psoriásicos. Assim, sendo a adrenalina um agonista do ADR β 2, havendo menos AD, há uma menor resposta destes receptores que associada a uma dessensibilização dos mesmos parece estar associado a uma exacerbação e/ou desenvolvimento da psoríase. Tal é coerente com resultados apresentados por Sivamani *et al.* em 2007, onde sugeriu que antagonistas do ADR β 2, como beta-bloqueantes, podem exacerbar ou mesmo iniciar o desenvolvimento da doença. Assim, estando a actividade da RTM associada à actividade do ADR β 2 (Marques & Bicho, 1997), servindo como um marcador biológico do que poderá estar a ocorrer a nível sistémico, parece evidente que havendo uma possível diminuição da actividade dos ADR β 2 em indivíduos psoriásicos, que os valores da actividade da RTM estariam então diminuídos. Desta forma o presente estudo sugere que possa haver uma relação entre o a variante COMT^H, a variante Gly16 do ADR β 2 e as baixas actividades da RTM no que respeita a exacerbação e/ou desenvolvimento da psoríase.

No entanto mais estudos terão de ser desenvolvidos, especialmente aumentando a amostragem, de modo a melhor averiguar as relações entre todos estes factores indicadas no presente estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresenta a hipótese de que uma maior degradação das catecolaminas pela variante COMT^H acompanhada uma baixa actividade da redutase transmembranar do eritrócito bem como por uma dessensibilização dos receptores β 2-adrenérgicos, promove uma menor resposta às catecolaminas por parte destes receptores. Desta forma menos cAMP é formado. Assim pela via da adenilato ciclase, ao promover uma diminuição de cálcio intracelular, que por diversas vias de sinalização celular promove a proliferação celular dos queratinócitos, característica da psoríase.

Tal hipótese é suportada pelos resultados obtidos no presente estudo, no entanto serão necessários mais estudos, nomeadamente um aumento do poder da amostra, bem como a quantificação do cAMP, para que conclusões mais definitivas sejam retiradas. Se confirmadas as tendências, estudos funcionais com as variantes em estudo iriam possivelmente melhorar a compreensão dos mecanismos desta doença.

BIBLIOGRAFIA

- Ambrose, H. J., Lawrance, R. M., Cresswell, C. J., Goldman, M., Meyers, D. A., & Bleecker, E. R. (2012). Effect of β 2-adrenergic receptor gene (ADRB2) 3' untranslated region polymorphisms on inhaled corticosteroid/long-acting β 2-adrenergic agonist response. *Respiratory Research*, 13(37), 1-9.
- Ammar, M., Zaraa, I., Bouclaka-Souissi, C., Doss, N., Dhaoui, R., Osman, A. B., . . . Gaaied, A. (2012). Immunogenetics of psoriasis: Update. *La tunisie Medicale*, 90(07), 512-517.
- Choi, W. J., Park, E. J., Kwon, I. H., Kim, K. H., & Kim, K. J. (2012). Association between Psoriasis and Cardiovascular Risk Factors in Korean Patients. *Ann Dermatol*, 22(3), 300-306.
- Christophers, E. (2006). Comorbidities in psoriasis. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*, 20(Suppl. 2), 52-55.
- Cohen, A. D., Gilutz, H., Henkin, Y., Zahger, D., Shapiro, J., Bonne, D. Y., & Vardy, D. A. (2007). Psoriasis and the Metabolic Syndrome. *Acta Derm Venereol*, 87, 506-509.
- Da Silva, A. P., Marinho, C., Rego, C., Barata, J. T., Sardinha, L., Lopes, C., . . . Bicho, M. P. (2008). (Abst) Erythrocyte Transmembrane Redox System (TMRS) Activity in Obesity. *XVI Congress of Biochemistry*. Ponta Delgada.
- Da Silva, A. P., Neves, J., Bicho, M. C., Carvalho, R., Lopes, C., CLARA, J. P., & Bicho, M. P. (2006). Actividade de Duas Enzimas Associadas à Apoptose e Envelhecimento Celular na Hipertensão Arterial. *Rev Port Cardiol*, 25(2), 189-195.
- Dias, Á. M., & Rodrigues, A. L. (2010). Esquizofrenia, genética, epigênese, ambiente: uma revisão sistemática das hipóteses etiológicas unificadas e do perfil genética; e um novo algoritmo para o tratamento dos achados principais. *Avances en Psicología Latinoamericana*, 29-41.
- Emerit I, A. J. (2011). Clastogenic Plasma Factors in Psoriasis-Comparison of Phototherapy and Anti-TNF- α Treatments. *Photochemistry and Photobiology*, 1-7.
- Erdal, M. E., Türsen, Ü., Kaya, T. I., Kanik, A., Derici, E., & Ikizoglu, G. (2004). Association between Catechol-O-Methyltransferase polymorphism and psoriasis. *International journal of Dermatology*, 43(4), 312-314.
- Erin, F., Erin, H., Iliyana, S., Stephen, E. K., & Andrew, B. (2007). Pathophysiology of Psoriasis: Recent Advances on IL-23 and Th17 Cytokines. *Curr Rheumatol Rep*, 9(6), 461-467.
- Flier, A. M., Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Sarma, V. J., & Ward, A. P. (2008). Catecholamines - crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora's Box? *MOL MED*, 14(3-4), 195-204.
- Flier, M. A., Rittirsch, D., Nadeau, B. A., Chen, A., Sarma, J. V., Zetoune, F. S., . . . Ward, P. A. (2007). Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature*, 449, 721-725.
- Fu, L. W., & Vender, R. (2011). Systemic Role for Vitamin D in the Treatment of Psoriasis and Metabolic Syndrome. *Dermatology Research and Practice*, 1-4.

- Gao, L., Li, H., Shen, Z., Liu, L., Li, C., Zhang, Z., & Liu, Y. (2009). Polymorphism of the catechol-O-methyltransferase gene in Han Chinese patients with psoriasis vulgaris. *Genetics and Molecular Biology*, 32(1), 32-36.
- Ghazizadeh, R., Shimizu, H., Tosa, M., & Ghazizadeh, M. (2010). Pathogenic Mechanisms Shared between Psoriasis and Cardiovascular Disease. *International Journal of Medical Sciences*, 7(5), 284-289.
- Glantz, S. A. (2002). *Primer of biostatistics* (Fifth Edition ed.). USA: McGraw-Hill - Medical Publishing Division.
- Gottlieb, A. B., & Dann, F. (2009). Comorbidities in Patients with Psoriasis. *The American Journal of Medicine*, 122(12), 1150.e1-1150.e9.
- Griffiths, C. E., & Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*, 370(9583), 263-271.
- Hall, J. M., desAngeles, C., Podawiltz, A., Mummert, D. I., Jones, H., & Mummert, M. E. (2012). Psychological Stress and the Cutaneous Immune Response: Roles of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Dermatology Research and Practice*, 1-11.
- Hawkins, G. A., Tantisira, K., Meyers, D. A., Ampleford, E. J., Moore, W. C., Klanderman, B., . . . Bleeker, E. R. (2006). Sequence, Haplotype, and Association Analysis of ADRB2 in a Multiethnic Asthma Case-Control Study. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE*, 174, 1101-1109.
- Henseler, T. (1997). The Genetics of Psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, s1-s11.
- Hesse, C., Schroeder, D. R., Nicholson, W. T., Hart, E. C., Curry, T. B., Penheiter, A. R., . . . Eisenach, J. H. (2010). Beta2-Adrenocetor gene variation and systemic vasodilatation during ganglionic blockade. *J Physiol*, 588(Pt 14), 2669-2678.
- Holer, T., Kruger, A., Schneider, P. M., Schopf, R. E., Knop, J., Rittner, C., . . . Marker-Hermann, E. (1997). A TNF-alfa Promoter Polymorphism Is Associated with Juvenile Onset Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Journal of Investigative Dermatology*, 109, 562-565.
- Johnson, M. (2001). Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *PAEDIATRIC RESPIRATORY REVIEWS*, 2, 57-62.
- Kato, N., Sugiyama, T., Morita, H., Kurihara, H., Sato, T., Yamori, Y., & Yazaki, Y. (2001). Association Analysis of b2-Adrenergic Receptor Polymorphisms With Hypertension in Japanese. *Hypertension*, 37, 286-292.
- Ladeiro, S., Lança, V., Silva, A. P., Granadeiro, L., Bicho, M. C., & Bicho, M. (2009). Catechol-o-methyltransferase: genotypes and allele frequencies in the portuguese population. *Arq. Port. Ciênc. Biol.*, xxxi(1,2), 149-150.
- Lahiri, D. K., & Nurnberguer Jr., J. I. (Nucleic Acid Research). 1991, 19(19), 5444.

- Langley, R. G., Krueger, G. G., & Griffiths, C. E. (2005). Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis*, *64*(Suppl II), ii18–ii23. doi:10.1136/ard.2004.033217
- Li, K., Li, C., Gao, L., Yang, L., Li, M., Liu, L., . . . Gao, T. (2009). A functional single-nucleotide polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene alter vitiligo risk in a Chinese population. *Arch Dermatol Res*, *301*, 681-687.
- Liggett, S. B. (2000). β 2-Adrenergic Receptor Pharmacogenetics. *Am J Respir Crit Care Med*, *161*, S197–S201.
- Liu, Y., Krueger, J. G., & Bowcock, A. M. (2007). Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes and Immunity*, *8*, 1-12.
- Malhotra, A. K., Kestler, L. J., Mazzanti, C., Bates, J. A., Goldberg, T., & Goldman, D. (2002). A functional Polimorphism in the COMT Gene and Performance n a Test of Prefrontal Cognition. *American Journal pf Psychiatry*, *159*(4), 652-654.
- Marques, F., & Bicho, M. P. (1997). Activation of a NADH Dehydrogenase in the Human Erythrocyte by Beta-Adrenergic Agonists: Possible Involvement of a G Protein in Enzyme Activation. *Biological Signals*, *6*, 52-61.
- Marson, F. A., Bertuzzo, C. S., Ribeiro, A. F., & Ribeiro, J. D. (2012). Polymorphisms in ADRB2 gene can modulate the response to bronchodilators and the severity of cystic fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*, *12*(50).
- McKusick, V. A. (6 de 4 de 1986). +109690 - BETA-2-ADRENERGIC RECEPTOR; ADRB2 . Obtido de OMIM: [http://omim.org/entry/109690?search=ADRB2 &highlight=ADRB2](http://omim.org/entry/109690?search=ADRB2&highlight=ADRB2)
- Mehta, N. N., Azfar, R. S., Shin, D. B., Neimann, A. L., Troxel, A. B., & Gelfand, J. M. (2012). Patients with severe psoriasis are ate increased risk of cardiovascular mortality: cohort study using the General Practice Research Database. *European Heart Journal*, *31*, 1000-1006.
- Mrowietz, U., & Reich, K. (2009). Psoriasis—New Insights Into Pathogenesis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, *106*(1-2), 11-19.
- Nestle, F., Kaplan, D., & Barker, J. (2009). Mechanisms of Disease Psoriasis. *the New England Journal of Medicine*, *361*, 496-509.
- Nosbaum, A., & Nicolas, J. (2009). *Physiopathologie du psoriasis*. Montrouge, France: John Libbey Eurotext.
- O'Neill, P. E. (1994). Common Skin Diseases. In D. P. Jenkins, *Military Dermatology* (pp. 549-595). New York: Department of the Army, Office of The Surgeon General, Borden Institute. Obtido de http://www.bordeninstitute.army.mil/published_volumes/dermatology/Ch20.pdf
- Ozkur, M., Erbagci, Z., Nacak, M., Tuncel, A., Gorucu, S., & Aynacioglu, A. S. (2004). Association of the Arg16Gly polymorphism of the beta-2-adrenergic receptor with psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, *35*, 162—164.
- Pereira, S. B., Cava, I. A., Giro, C., & Mesquita, E. T. (2010). Adrenergic Receptor Polymorphism in Heart Failure: What can Genetics Explain? *Arq Bras Cardiol*, *94*(6), 789-797.

- Proença, D. (2006). *Associação entre os Polimorfismos dos genes CYP1A1 e CYP1A2, com concentrações plasmáticas de 17β-estradiol e com a Actividade do Redutase Transmembranar do Ferricianeto Dependente do NADH, em diferentes Patologias*. Faro.
- Qin, X., Peng, Q., Qin, A., Chen, Z., Lin, L., Deng, Y., . . . Zhao, J. (2012). Association of COMT Val158Met polymorphism and breast cancer risk: an updated meta-analysis. *Diagnostic Pathology*, 7(136).
- Raychaudhuri, S. K., Chatterjee, S., Nguyen, C., Kaur, M., Jialal, I., & Raychaudhuri, S. P. (2010). Increased Prevalence of the Metabolic Syndrome in Patients with Psoriatic Arthritis. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 8(4), 331-334.
- Sanz, L. P. (2007). Psoriasis, a Systemic Disease? *Actas Dermosifiliogr.*, 98, 396-402.
- Silva, M. E. (2001). *Contribuição para o estudo das bases fisopatológicas do Síndrome do Prolapso da Valvula Mitral*. Lisboa.
- Sivamani, R. K., Lam, S. T., & Isseroff, R. R. (2007). Beta Adrenergic Receptors in Keratinocytes. *Dermatol Clin.*, 25(4), 643-x.
- Snyder, E. M., Hulsebus, M. L., Turner, S. T., Joyner, M. J., & Johnson, B. D. (2006). Genotype related differences in beta2 adrenergic receptor density and cardiac function. *Med Sci sports Exerc.*, 38(5), 882-886.
- Steinkraus, V., Steinfath, M., Stove, L., Korner, C., Abeck, D., & Mensing, H. (1993). [I-Adrenergic receptors in psoriasis: evidence for down-regulation in lesional skin. *Arch Dermatol Res*, 285, 300-304.
- Stern, R. S. (2010). Psoriasis Is Not a Useful Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 130, 917-919.
- Stolk, L., van Meurs, J. B., Jhamai, M., Arp, P. P., van Leeuwen, J. P., Hofman, A., . . . Uitterlinden, A. G. (2006). The Catechol-O-Methyltransferase Met158 Low-Activity Allele and Association with Nonvertebral Fracture Risk in Elderly Men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(8), 3206–3212.
- Suárez-Fariñas, M., Li, K., Fuentes-Duculan, J., Hayden, K., Brodmerkel, C., & Krueger, J. G. (2012). Expanding the Psoriasis Disease Profile: Interrogation of the Skin and Serum of Patients with Moderate-to-Severe Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 1-13.
- Tanaka, Y., Sasaki, M., Shiina, H., Tokizane, T., Deguchi, M., Hirata, H., . . . Okuyama, A. (2006). Catechol-O-metiltransferase Gene Polymorphism in Binign Protastic Hyperplasia and Sporadic Prostate cancer. *Cancer Edidemiology, Biomarkers and Prevention*, 15(2), 238-244. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0550
- Traub, M., & Marshall, K. (2007). Psoriasis – Pathophysiology, Conventional, and Alternative Approaches to Treatment. *Alternative Medicine Review*, 12(4), 319-330.

- Vargas-Alarcón, G., Fragoso, J.-M., Cruz-Robles, D., Vargas, A., Vargas, A., Lao-Villadóniga, J.-I., . . . Martínez-Lavín, M. (2007). Catechol-O-methyltransferase gene haplotypes in Mexican and Spanish patients with fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*, 1-7.
- Wang, C.-S. (1980). Human Erythrocyte NADH: (Acceptor) Oxidoreductase Kinetic Properties and Competitive Substrate Inhibition by Ferricyanide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 616, 22--29.
- Worda, C., Sator, M. O., Schneeberger, C., Jantschev, T., Ferlitsch, K., & Huber, J. (2003). Influence of the catechol-O-methyltransferase (COMT) codon 158 polymorphism on estrogen levels in woman. *Human Reproduction*, 18(2), 262-266.
- Zangeneh, F. Z., Fazeli, A., & Shooshtary, F. S. (2012). Psoriasis and Stress - Psoriasis Aspect of Psychoneuroendocrinology. In D. J. Soung (Ed.), *psoriasis* (pp. 187-208). Tehran, Iran: InTech.

ANEXOS

Anexo I

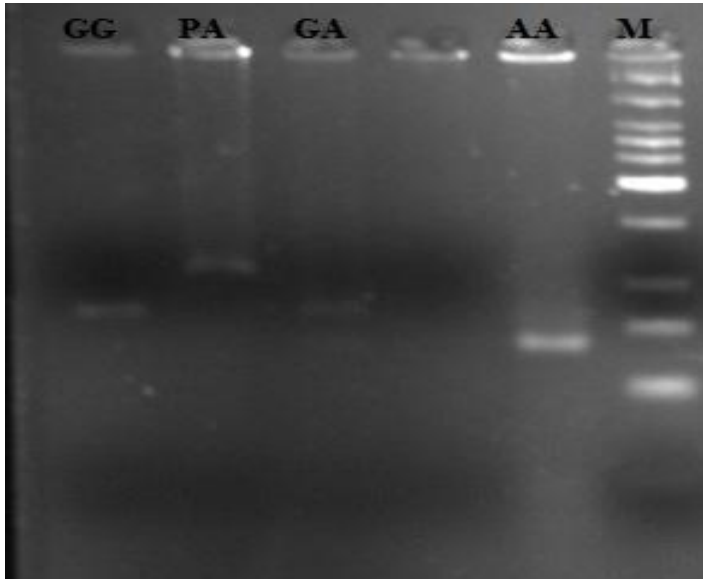


Figura 5 - Gel de restrição do gene COMT. 1 - um individuo GG (com uma banda de 89bp), 2- Produto de amplificação (111bp); 3- individuo GA (com uma banda de 89, 71bp); 5- indivíduo AA(71bp); 6 - marcador de pesos moleculares (DNA Ladders from New England Biolabs.Inc - Low Molecular Weight DNA Ladder).

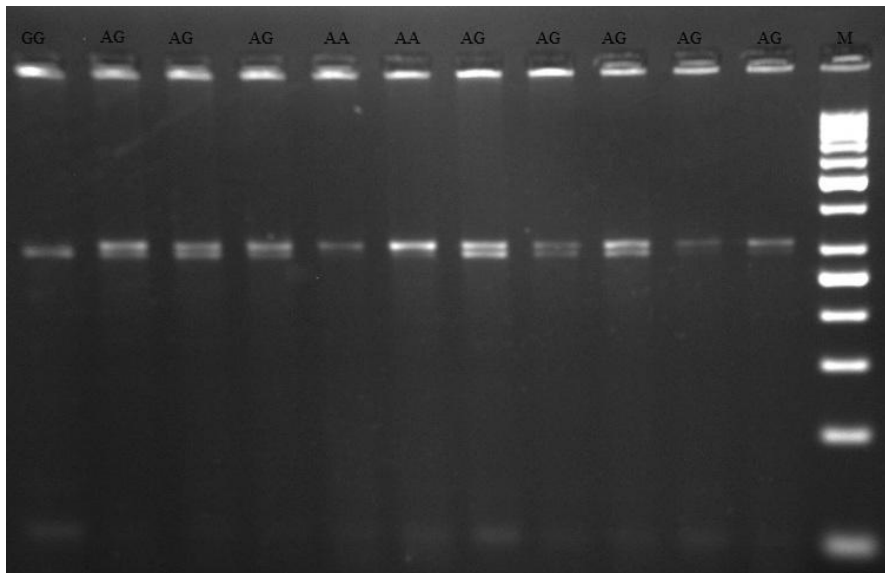


Figura 6 - Gel de restrição do gene ADR β 2. 1 - um individuo GG (com uma banda de 291bp); 2-4 e 7-11 - indivíduo AG(com uma banda de 308 e outra de 291bp); 15-6 - individuo AA (com uma banda de 308bp); 12- marcador de pesos moleculares (Termo Scientific GenerRuler 50bp DNA Ladder).

Quadro 10 - Risco relativo para a associação entre os alelos da COMT e a psoríase

	Controlo (%)	Doentes (%)	OR	IC (95%)	P*
COMT (H)	237 (54.4%)	52 (63.4%)	1.455	0.894-2.369	0.164
COMT (L)	199 (45.6%)	30(36.6%)	1		

*Nível de significância 0.05

Quadro 11 - Associações entre os polimorfismos da COMT e a Actividade da Redutase Transmembranar na população controlo e doente

	RTM	N	Média	σ	Mediana	Mínimo	Máximo	Sig
Controlos COMT	GG	18	5.434	1.860	5.447	3.118	9.947	
	GA	52	7.347	15.481	5.103	1.053	115.893	0.469 ^a
	AA	12	10.543	22.537	4.492	1.245	81.884	
Doentes COMT	GG	14	2.192	1.510		0.896	7.034	
	GA	24	2.099	0.906		0.633	3.784	0.732 ^b
	AA	3	2.684	1.868		1.266	4.800	

^aSignificância dos testes não paramétricos - Kruskal Wallis e Mann U Whitney, nível de significância 0.05^bSignificância da ANOVA, nível de significância 0.05**Quadro 12 - Associações entre os polimorfismos da ADR β 2 e a Actividade da Redutase transmembranar na população controlo e doente**

	RTM	N	Média	σ	Mediana	Mínimo	Máximo	Sig
Controlos ADR β 2	AA	7			5.794	1.991	81.884	
	AG	7			4.376	3.615	8.011	0.259 ^a
	GG	0			-	-	-	
Doentes ADR β 2	AA	17	2.300	1.402		1.142	7.034	
	AG	18	2.183	1.084		0.896	4.800	0.646 ^b
	GG	7	1.789	1.022		0.266	2.988	

^aSignificância dos testes não paramétricos - Kruskal Wallis e Mann U Whitney, nível de significância 0.05^bSignificância da ANOVA, nível de significância 0.05**Quadro 13 - Comparação entre a distribuição do valor da RTM pelos genótipos da COMT entre controlos e doentes.**

COMT	RTM	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Sig
GG	controlo	18	5.447	3.118	9.947	0.000
	doentes	14	2.014	0.896	7.034	
GA	controlo	52	5.103	1.053	115.893	0.000
	doentes	24	1.523	0.633	3.784	
AA	controlo	12	4.491	1.245	81.884	0.295
	doentes	3	1.986	1.868	1.266	

Quadro 14 - Comparação entre a distribuição do valor da RTM pelos genótipos do ADR β 2 entre controlos e doentes.

ADR β 2	RTM	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Sig
AA	controlo	7	5.794	1.991	81.884	0.001
	doentes	17	1.986	1.142	7.034	
AG	controlo	7	4.370	3.615	8.011	0.000
	doentes	18	1.841	0.896	4.800	
GG	controlo	0				-
	doentes	7				

Anexo II

Protocolo Experimental: Extracção de DNA pelo método de *salting-out*

1. O sangue periférico é colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transfere-se 2mL para um tubo rolhado e graduado de 10mL.
3. Adiciona-se 1 volume de TKM X-100 tendo o cuidado de adicionar parte deste tubo onde a amostra foi colhida de forma a evitar desperdícios de sangue.
4. Adiciona-se 50mL de IPGEPAL CA 630 por cada mL de sangue, com o objectivo de lisar as células, com consequente libertação de DNA e outros constituintes celulares.
5. O tubo é agitado 4-5 vezes por inversão vigorosa.
6. Segue-se uma centrifugação a 2200rpm, à temperatura de aproximadamente 4°C, durante 15min, que deve ser repetida caso o *pellet* formado não adira ao fundo do tubo.
7. O sobrenadante é rejeitado e ao *pellet* que contém, entre outros constituintes, o DNA, é adicionado 2mL de tampão TKM 1 por cada mL de sangue.
8. Centrifuga-se à mesma temperatura, a 1600rpm e por um período de 10min e são repetidos os passos de rejeição do *pellet* e adição de tampão TKM 1.
9. O passo anterior é repetido no máximo 2 vezes, de forma a obter um *pellet* branco, evitando assim perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspende-se o *pellet* (vórtex) na solução TKM 2 numa proporção de 160mL de tampão por mL de sangue.
11. Adiciona-se 20mL de SDS 10% por mL de sangue e a mistura é ressuspensa com o auxílio de uma micropipeta. Este reagente dissolve as proteínas ainda existentes em solução.
12. Incuba-se a 55°C durante 10min.

13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo é transferido para um *ependorf* ao qual se adicionam 60 μ L de NaCl saturado por mL de sangue. Visualiza-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que formam uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA).
14. Agita-se o tubo *ependorf* (vórtex).
15. Centrifuga-se (centrífuga de *ependorfs*) a 1200rpm, à temperatura ambiente e por 30min (*salting-out*).
16. Verte-se o sobrenadante, que contém o DNA, resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionam-se 2 volumes de etanol absoluto gelado (colocado a -20°C, cerca de 5min antes de ser utilizado).
17. O tubo, devidamente selado com parafilme, é invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Ressuspende-se o DNA em 200 μ L de tampão TE previamente colocados no tubo *ependorf* devidamente rotulado e armazena-se a 4°C.

Anexo III

Actividade da Redutase Transmembranar

Em quatro tubos diferentes (B0, T0, B20, T20) adicionou-se 1,4 mL de tampão fosfato salino 0.1 M pH 7.4 com glucose (10mM) e 75µL de glóbulos vermelhos lavados. Incubou-se os 4 tubos de ensaio num banho-maria a 37°C durante 5 min com agitação. Após este tempo adiciona-se 25 µL de Ferricianeto 0.1 M em NaCl 0.9% (v/v) aos tubos T0 e T20. Parou-se a incubação dos tubos B0 e T0, centrifugando-os a 2000rpm a 4°C durante 10min. Os tubos B20 e T20 continuaram a incubação até perfazer 20min. Após este tempo parou-se a incubação e centrifugou-se os tubos durante 10 min a 2000 rpm e a 4°C. Retirou-se 700 µL dos sobrenadantes da centrifugação e colocaram-se em tubos com a devida identificação. Adiciona-se 12,5 µL de ferricianeto 0.1 M em NaCl 0.9% (v/v) aos B0 e B20. Incubou-se o B20 em banho-maria a 37°C durante 20 min com agitação enquanto os restantes foram colocados a 4°C.

Mistura reaccional (na proporção 2:2:1:1):

- Acetato de sódio 3M pH 6 (acertado com ácido acético 0.1M),
- Ácido cítrico 0.2M,
- Cloreto Férrico 0.0033M (em ácido acético 0.1M)
- Batofenantrolina $6.74 \times 10^{-3}M$

Para as leituras colocou-se no tubo de referência 700µL de H₂O e 300 µL da mistura reaccional. Nos restantes tubos colocou-se 600 µL de H₂O, 100 µL do sobrenadante respectivo (B0, B20, T0 e T20) e 300 µL mistura reaccional. Agitou-se no vórtex e colocou-se no escuro durante 5min. Por fim leram-se as absorvências a 535nm.

A determinação do hematócrito fez-se passando os glóbulos vermelhos lavados por um tubo capilar. Centrifugou-se os capilares a 15250 g durante 7 min. Uma vez centrifugados determinou-se o volume de células relativamente ao volume total da suspensão, comparando a altura da coluna de células com a altura da coluna de líquido.

7.1. Curva de calibração

Nesta técnica, que tem por base a reacção enzimática onde o ferricianeto é convertido em ferrocianeto pela redutase transmembranar, sendo este último o produto da reacção que vai ser medido aquando da leitura das absorvências.

Desta forma a curva de calibração foi efectuada a partir da leitura das absorvências de diluições de ferrocianeto, com diferentes concentrações (Figura 7).

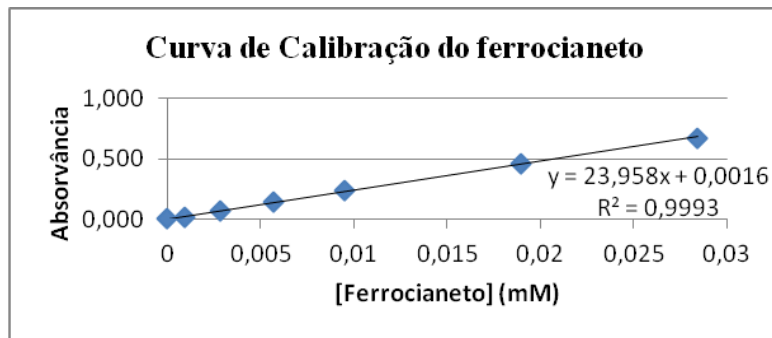


Figura 7 - Curva de Calibração do Ferrocianeto, necessária à técnica "Actividade da Redutase Transmembranar"

Da curva de calibração (Abs/[ferrocianeto]) retirou-se o valor do declive que equivale ao ϵ do cálculo da redutase.

7.2. Cálculo da Actividade da Redutase

A actividade da Redutase Transmembranar é calculada de acordo com a equação:

$$Act (mmol/Lcél/h) = \left(\frac{1 - Htf}{Htf} \times \frac{3 \times \Delta f}{\epsilon} \right) \times 10$$

sendo que Htf é o hematócrito final calculado pela equação $Htf = \frac{Ht \times 0.3}{6}$, Δf é dado pela equação $\Delta f = (AbsT20 - AbsT0) - (AbsB20 - AbsB0)$ correspondendo à diferença do valor das absorvências medidas no tempo 20min de incubação e as absorvências medidas no tempo 0, e ϵ corresponde ao coeficiente de correlação do ferrocianeto que foi determinado a partir da curva de calibração (ϵ = declive da recta da curva de calibração).