

Bibiana Sgorla de Almeida

POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-G* EM PACIENTES COM PSORÍASE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilíada Rainha de Souza

Coorientadora: Dr^a. Yara Costa Netto Muniz

Florianópolis
2012.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Almeida, Bibiana Sgorla de
Polimorfismos do gene HLA-G em pacientes com psoríase.
[dissertação] / Bibiana Sgorla de Almeida ; orientadora,
Ilíada Rainha de Souza ; co-orientadora, Yara Costa Netto
Muniz. - Florianópolis, SC, 2012.
117 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Psoríase.
3. HLA-G. 4. Polimorfismos. I. Souza, Ilíada Rainha de .
II. Muniz, Yara Costa Netto. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste mestrado...

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ilíada Rainha de Souza, pelas lições científicas e de vida, pela paciência e principalmente pela oportunidade de realizar este mestrado em seu laboratório, mesmo sabendo das dificuldades de orientar pessoas, que assim como eu, não podem dedicar-se exclusivamente à pós-graduação. São raros os orientadores que aceitam alunos assim... MUITO OBRIGADA!

À minha coorientadora, Dr^a Yara Costa Netto Muniz, pela imensa ajuda na realização deste mestrado, pelos “salvamentos” nos momentos de quase desespero, pelas paciosas explicações, pela presença constante, pelo bom humor e pela amizade! Sorte dos alunos e da universidade que a tiverem como professora!!

À diretora do Centro de Ciências Biológicas, Prof^a Dr^a Sonia Gonçalves Carobrez, e ao ex-vice-diretor, Prof Dr Jamil Assrey, pela oportunidade e pelo apoio dados para a realização deste mestrado!

A todos os voluntários que aceitaram participar deste estudo, em especial aos pacientes do Ambulatório de Dermatologia/Psoríase do Hospital Nereu Ramos.

Ao Dr Daniel Holthausen Nunes, à Dr^a Vanessa Martins e à Dr^a Mariana Mazzochi Sens pelo auxílio no contato com os pacientes e pelo empenho para que esses aceitassem participar deste estudo.

Às funcionárias do Ambulatório do Hospital Nereu Ramos, pelo auxílio nas coletas das amostras dos pacientes.

Ao IGP-SC, especialmente à minha colega Sandra Rachadel Torres, pelo auxílio no sequenciamento das amostras analisadas neste estudo.

A todos os colegas do LAPOGE, mas de maneira muito especial à Dr^a Andrea Rita Marrero, por todo o auxílio durante esse mestrado, pelos bolos sem lactose e por ter me ensinado “lições” sobre mariscos, mares e costões... nunca vou esquecer! À Mariáh Damiani, pela parceria nos experimentos, pela divisão das “tensões” e das dúvidas, pelos momentos de descontração e por muitas outras coisas... obrigada xuxulita!! À Amanda Firmino e Leili Hausmann por toda a disposição em me ajudar!!

Aos meus pais, Fernando e Luci, e ao meu irmão, Lucas, por terem sempre me incentivado e me apoiado nas minhas escolhas, por,

mesmo morando longe, sempre participarem, de uma maneira ou de outra, de tudo o que acontece na minha vida, por terem despertado em mim o gosto pelos livros e por tantas outras coisas... OBRIGADA! AMO VOCÊS! Ah, e à Ísis, por ser fofinha.

“...com o tempo você aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha...” William Shakespeare

Ao meu colega de LAMEB e grande amigo, Denis Dall Agnolo, pelas “coberturas” de horários para que eu pudesse cursar as disciplinas, por me aguentar tagarelando oito horas por dia, pelas risadas e pelos cupons dos sites de compras coletivas!! À Vanessa Silva, recém-chegada no LAMEB, mas que acompanhou a etapa final desse mestrado!

À minha “família florianopolitana”, meus amigos queridos, Ana Paula Luiz, Alessandra Antunes, Marina Córdova, Mariana Appel Hort, Aline Remor, Fábio Borges e Daiane Bobermim, que me ajudaram e me aguentaram durante esse mestrado e que fizeram com que tudo fosse mais fácil e mais divertido, OBRIGADA!

“Tenho amigos pra saber quem sou!” Oscar Wilde

“Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas.”
Autoria Desconhecida

RESUMO

ALMEIDA, BS. **Polimorfismos do gene *HLA-G* em pacientes com psoríase**. 2012. 117p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, de etiologia desconhecida, que afeta a pele e as articulações. Nessa doença, assim como em outras doenças inflamatórias, tem sido observada a indução da expressão do gene *HLA-G* e a molécula produzida é sugerida como um possível mecanismo de proteção tecidual às respostas imunes pró-inflamatórias. O *HLA-G* possui na sua 3'UTR oito sítios polimórficos descritos: um polimorfismo de presença ou ausência de um fragmento de 14pb (14pb *InDel*) e sete SNPs (+3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G e +3196 G/C). A partir disso, o objetivo deste estudo foi genotipar os polimorfismos da 3'UTR, em 100 pacientes e 100 controles (pareados por idade e gênero) e verificar a influência desses polimorfismos na patogênese da doença. Para isso, foi realizado um levantamento de dados epidemiológicos relacionados ao desenvolvimento e gravidade da doença (presença de sintomas de artrite psoriásica, história familiar para a psoríase e idade de manifestação dos primeiros sintomas da doença) e estes foram testados como fatores de risco. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita por PCR e visualizada em PAGE 7% corado com nitrato de prata, no qual o polimorfismo de 14pb foi identificado, e por sequenciamento os outros sete SNPs. Do total de pacientes, 57 eram mulheres, 44 indivíduos apresentaram casos na família, 43 manifestaram a doença antes dos 30 anos e 16 manifestaram artrite psoriásica. Foram realizados cálculos das frequências alélicas e genotípicas, análises de associações e a inferência de haplótipos. Após as análises foram encontradas associações, para pacientes que apresentam sintomas de artrite psoriásica, com o alelo **Del* (OR=2,929; $p=0,019$) e o genótipo **DelDel* (OR=4,398; $p=0,015$) do polimorfismo de 14pb, assim como o genótipo +3142**CC* (OR=6,02; $p=0,015$) e para aqueles que apresentaram sintomas antes dos 30 anos de idade o genótipo +3003**CT* (OR=0,046; $p=0,013$). Em conclusão, os polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G* são associados à doença bem como aos dados epidemiológicos considerados neste trabalho.

Palavras-chave: Psoríase. HLA-G. Polimorfismos.

ABSTRACT

ALMEIDA, BS. **Polimorphisms of *HLA-G* gene in patients with psoriasis**. 2012. 117p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Psoriasis is a chronic inflammatory disease, of unknown etiology, that affects the skin and joints. In this disease, as well as other inflammatory diseases, has been observed an expression induction of *HLA-G* gene and the molecule produced is suggested as a possible mechanism of tissue protection against the proinflammatory immune responses. The *HLA-G* has, at its 3'UTR, eight polymorphic sites described: a polymorphism with presence or absence of a 14bp fragment (14bp InDel) and seven SNPs (+3003 T / C +3010 C / G +3027 A / C +3035 C / T +3142 G / C +3187 A / G and +3196 G / C). From this, the objective of this study was to genotype the 3'UTR polymorphisms in 100 patients and 100 controls (matched for age and gender) and to observe the influence of these polymorphisms in the pathogenesis of the disease. For this, a survey was conducted with the epidemiological data related to the development and severity of illness (symptoms of psoriatic arthritis, familial history for psoriasis and age at onset of the first symptoms of the disease) and these were tested as risk factors. The DNA was extracted from whole blood and genotyping was made by PCR and visualized on PAGE 7% stained with silver nitrate, in which the 14bp polymorphism was identified and by sequencing of the seven other SNPs. Of all patients, 57 were women, 44 individuals had cases in the family, 43 manifested the disease before the thirties and 16 expressed psoriatic arthritis. The allele and genotype frequencies, the association analyses and the haplotypes inference were calculated. After analysis was found, for patients who exhibit symptoms of psoriatic arthritis, association with the allele **Del* (OR=2.929, $p=0.019$) and with the genotype **Del*Del* (OR=4.398, $p=0.015$), for the 14bp polymorphism and with the genotype +3142**C***C** (OR=6.02, $p=0.015$); and, for those who had symptoms before the thirties, the association observed was with the genotype +3003**C***T* (OR=0.046, $p=0.013$). In conclusion, the polymorphisms 3'UTR, of *HLA-G* gene, are associated with the disease as well as the epidemiological data considered in this study.

Keywords: Psoriasis. *HLA-G*. Polimorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O MHC Humano. A localização do MHC humano no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes dentro das classes II, III e I, em amarelo, está destacado, o locus <i>HLA-G</i> (adaptado de Cambridge Journals, 2012).....	30
Figura 2 – O mRNA primário do gene <i>HLA-G</i> . A estrutura molecular do mRNA primário do <i>HLA-G</i> , na qual estão identificados os oito <i>exons</i> , o codon de parada no <i>exon 6</i> e dois <i>introns</i> , <i>i2</i> e <i>i4</i> (adaptado de CAROSELLA et al., 2008).....	33
Figura 3 – As sete isoformas da molécula <i>HLA-G</i> produzidas por splicing alternativo. As isoformas solúveis são geradas por excisão de um ou dois <i>exons</i> que codificam domínios globulares, enquanto que a tradução do <i>intron 2</i> ou do <i>intron 4</i> produz isoformas solúveis, que não possuem o domínio transmembrana (adaptado de DONADI et al., 2011).....	34
Figura 4 – Nomenclatura dos Alelos de <i>HLA-G</i> . Padronização da nomenclatura dos alelos <i>HLA-G</i> de acordo com o <i>WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System</i> (adaptado de <i>HLA Nomenclature</i> , 2012A).....	36
Figura 5 – Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. O gel digitalizado ilustra a presença de uma inserção (1), uma deleção (2) e uma inserção/deleção (3).....	50
Figura 6 – Cromatograma resultante do alinhamento de uma das amostras sequenciadas. Nesta ilustração estão representados os SNPs +3030 (Y) e +3010 (S). Para o primeiro SNP (Y), o indivíduo em questão é homocigoto (GG) enquanto que, para o segundo SNP (S) é heterocigoto (GC).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequências dos haplótipos da 3'UTR do gene HLA-G no Brasil.....	38
Tabela 2 – Classificação da amostra, de acordo com gênero e idade, entre pacientes com psoríase (casos) e indivíduos saudáveis (controles).....	57
Tabela 3 – Classificação da amostra de casos, em valores absolutos, de acordo com a ocorrência de artrite psoriásica.....	57
Tabela 4 – Classificação da amostra de casos, em valores absolutos, de acordo com a idade em que ocorreu a manifestação dos primeiros sintomas da psoríase.....	58
Tabela 5 – Classificação da amostra de casos, em valores absolutos, de acordo com a presença de psoríase no histórico familiar.....	59
Tabela 6 – Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e p	61
Tabela 7 – Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a ocorrência de artrite psoriásica, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e p	65
Tabela 8 – Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a idade de manifestação dos primeiros sintomas da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e p	69
Tabela 9 – Frequências alélicas e genotípicas para a população de casos, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o histórico familiar de psoríase, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e p	73
Tabela 10 – Probabilidades (p) do teste exato de desequilíbrio de ligação para os oito sítios polimórficos detectados na 3'UTR do HLA-G ($p \leq 0,05$).....	77

Tabela 11 – Haplótipos inferidos para 3'UTR de HLA-G, 78
suas frequências para as populações de casos e controles,
cálculos de associação (OR) entre os haplótipos e o
desenvolvimento da psoríase, valores de intervalo de
confiança (IC 95%) e *p*.....

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
DEL	Deleção
EGF	Fator de crescimento epidermal
β_2m	beta 2 microglobulina
EXO	Exonuclease I
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
GVDH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Complexo de histocompatibilidade humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IGP-SC	Instituto Geral de Perícias do Estado de Santa Catarina
IL	Interleucina
ILT	Receptor de leucócitos semelhantes à imunoglobulina
IN	Inserção
ITIM	Motivo inibidor baseado em tirosina
kDa	Kilodalton
KIR	Receptor de células NK semelhantes à imunoglobulina
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LD	Desequilíbrio de ligação
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
NF κ B	Fator nuclear kappa b
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> , Razão de Chances
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Th	Célula T <i>helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
URR	Região reguladora a montante
UTR	Região não traduzida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	AS CARACTERÍSTICAS DA PSORÍASE.....	21
1.2	A PATOGÊNESE DA PSORÍASE.....	25
1.3	A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE.....	28
1.4	HLA-G: O GENE E A MOLÉCULA.....	30
1.4.1	Histórico.....	32
1.4.2	Estrutura do gene.....	32
1.4.3	Estrutura da molécula.....	33
1.4.4	Nomenclatura dos Alelos de HLA-G.....	35
1.4.5	Polimorfismos do HLA-G.....	36
2	JUSTIFICATIVA.....	41
3	OBJETIVOS.....	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	45
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	45
4.3	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	45
4.4	GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO INDEL DA REGIÃO 3'UTR.....	47
4.4.1	Reação em Cadeia da Polimerase.....	47
4.4.2	Análise do Produto Amplificado.....	48
4.4.3	Coloração com Nitrato de Prata.....	49
4.4.4	Leitura dos Resultados no Gel.....	50
4.5	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO 3'UTR.....	50
4.5.1	Purificação das Amostras.....	50
4.5.2	PCR para a Reação de Sequenciamento.....	51
4.5.3	Precipitação das Amostras.....	51
4.5.4	Leitura do Sequenciamento das Amostras.....	52
4.5.5	Análises das Sequências.....	52
4.6	TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4.6.1	Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	53
4.6.2	Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas.....	54
4.6.3	Análises de Associação.....	54
4.6.4	Desquilíbrio de Ligação.....	55

4.6.5	Inferência de Haplótipos.....	55
5	RESULTADOS.....	57
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	57
5.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	59
5.2.1	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	59
5.2.2	Frequências Alélicas, Genóticas e Análises de Associação.....	59
5.3	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	77
5.4	INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS.....	77
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICE A – Questionário pacientes com psoríase.....	93
	APÊNDICE B – Questionário indivíduos-controle.....	97
	APÊNDICE C – Termo de consentimento livre esclarecido.....	101
	APÊNDICE D – Termo de consentimento livre esclarecido indivíduos-controle.....	105
	APÊNDICE E – Cálculo de OR para caso (sim) controles (não).....	109
	APÊNDICE F – Cálculo de OR para pacientes com artrite e sem artrite.....	111
	APÊNDICE G – Cálculo de OR para pacientes com idade inferior e superior a 30 anos.....	113
	APÊNDICE H – Cálculo de OR para pacientes com e sem histórico familiar de psoríase.....	115
	APÊNDICE I – Cálculo de OR para pacientes e controles considerando os haplótipos.....	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 AS CARACTERÍSTICAS DA PSORÍASE

A psoríase (do grego *psora*, que significa: prurido, coceira) é uma doença inflamatória crônica, de etiologia desconhecida, que afeta a pele e as articulações (DUNPHY; GARDINER, 2011; PERERA *et al.*, 2012; RES *et al.*, 2010). Essa patologia é caracterizada pelo surgimento de lesões róseas ou avermelhadas recobertas por placas que atingem, principalmente, cotovelos, joelhos e couro cabeludo (MAK *et al.*, 2009).

As primeiras descrições da doença ocorreram ainda na antiguidade e, devido às características das lesões, acreditou-se, inicialmente, que a psoríase era uma variante de lepra (hanseníase). Em 1808, Robert Willian, um dermatologista britânico, distinguiu a psoríase da hanseníase, mas subdividindo-a, de acordo com as apresentações clínicas, em: *lepra graecorum* e *psora leprosa*. Essa subdivisão permaneceu até 1841, quando, o dermatologista vienense, Ferdinand von Hebra as identificou como uma única doença (GRIFFITHS; BARKER, 2007; NESTLE *et al.*, 2009; PERERA *et al.*, 2012). No entanto, apesar de ser caracterizada como uma única patologia, os pacientes que sofrem dessa doença podem apresentar fenótipos clínicos bastante variados. Esses fenótipos têm sido classificados através dos aspectos clínicos e da morfologia das lesões (CARDILI, *et al.*; DUNPHY; GARDINER, 2011; PERERA *et al.*, 2012).

A maioria dos indivíduos afetados por essa patologia apresenta subtipos de psoríase cutânea. Dentre esses subtipos, a psoríase vulgar (*psoriasis vulgaris*), que corresponde a cerca de 90% dos casos, é o fenótipo mais comum. Nesse subtipo, os pacientes apresentam as lesões características da doença: inflamações na pele, em forma de pápulas, róseas ou avermelhadas, e escamosas, recobertas por placas, brancas ou prateadas, de espessura variada (DUNPHY; GARDINER, 2011; GRIFFITHS; BARKER, 2007; HUEBER; MCINNES, 2007; NESTLE, *et al.*, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2009).

Dentre os subtipos de psoríase cutânea menos comuns estão: a psoríase em gotas (*psoriasis guttate*), caracterizada por pequenas pápulas dispersas pelo corpo, que atinge em torno de 10% dos pacientes; e a psoríase pustulosa (*pustular psoriasis*), que é a forma mais incomum da doença, na qual grandes áreas da pele apresentam-se inflamadas e

com lesões purulentas (CARDILI, R. *et al.*, 2010; DUNPHY; GARDINER, 2011; GRIFFITHS; BARKER, 2007; HUEBER; MCINNES, 2007).

As reações inflamatórias da psoríase são, usualmente, limitadas à pele. No entanto, nos casos de artrite psoriásica (*psoriatic arthritis*), que podem ocorrer em pacientes que manifestam ou não psoríase cutânea, as reações inflamatórias afetam também ligamentos, tendões e articulações (FELETAR *et al.*, 2008). Na grande maioria desses casos (em torno de 70%) os sintomas nas articulações surgem após o aparecimento das lesões cutâneas. No entanto, as manifestações articulares podem preceder as cutâneas (14 a 21% dos casos) ou apresentarem-se de maneira concomitante (11 a 15% dos pacientes) (MAK *et al.*, 2009).

Embora ocorra de maneira diferenciada entre determinadas populações, regiões geográficas e grupos étnicos, a distribuição da psoríase é universal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2009). Estudos mostram que os índices mais altos de indivíduos acometidos pela doença são registrados em regiões mais frias. As populações norte-americana e canadense, por exemplo, apresentam uma prevalência de psoríase em torno de 4,5%. Esses valores são ainda maiores em algumas populações do Norte da Rússia, nas quais cerca de 10% dos indivíduos são afetados pela psoríase (GUDJONSSON; ELDER, 2007; PERERA *et al.*, 2012).

Por outro lado, populações de regiões mais quentes, como as de áreas tropicais, apresentam índices mais baixos dessa patologia, chegando a serem próximos ou iguais a zero em alguns grupos populacionais. Esses são os casos, por exemplo, de algumas populações asiáticas, ameríndias, africanas e afro-americanas, nas quais a prevalência da psoríase está entre 0,4 a 0,7% (PERERA *et al.*, 2012; VALENZUELA *et al.*, 2011).

Entretanto, apesar das variações nos percentuais de pessoas afetadas pela doença, acredita-se que a sua prevalência mundial média seja em torno de 2 a 3%. Estudos populacionais realizados em vários países, como Alemanha, Inglaterra, Espanha e Suécia, apresentaram índices de psoríase próximos a esses valores (GUDJONSSON; ELDER, 2007; MELNIKOVA, 2009).

Ao contrário das populações citadas anteriormente, no Brasil não existem dados oficiais nem estudos epidemiológicos sobre o número de casos de psoríase no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE

DERMATOLOGIA, 2009). No entanto, se forem levados em consideração os dados do último censo, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010, e se o Brasil seguir a prevalência média mundial de psoríase, existem, aproximadamente, dois milhões de brasileiros afetados por esta patologia.

Nos últimos anos, pesquisadores e clínicos têm relatado e documentado o impacto na qualidade de vida causado pela psoríase. Nessa doença de caráter recidivante, a aparência da pele consiste, muitas vezes, no seu pior aspecto, resultando em baixa auto-estima, rejeição e depressão (GRIFFITHS; BARKER, 2007; MELNIKOVA, 2009; PERERA *et al.*, 2012; VALENZUELA *et al.*, 2011).

As dificuldades associadas às limitações das atividades diárias e laborais, causadas pelos sintomas da psoríase, também influenciam a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, causam redução na função ocupacional, perda da produtividade e, muitas vezes, aposentadoria precoce dos indivíduos afetados. De acordo com dados da Fundação Nacional de Psoríase dos EUA, os custos anuais, diretos e indiretos, com a doença excedem 11 bilhões de dólares, sendo que os gastos decorrentes com os dias de trabalho perdidos representam 40% desses encargos (GRIFFITHS; BARKER, 2007; MELNIKOVA, 2009).

A psoríase acomete igualmente homens e mulheres e seus primeiros sinais podem aparecer em qualquer idade (GUDJONSSON; ELDER, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2009). Apesar disso, nessa patologia, são observados dois picos de incidência um entre 15 e 30 anos e outro entre 50 e 60 anos (GRIFFITHS; BARKER, 2007; PERERA *et al.*, 2012). O surgimento dos primeiros sintomas da psoríase antes dos 15 anos está correlacionado com uma maior gravidade da doença e com a presença de outros casos na família. Sendo, esse último, um dos indícios do envolvimento de fatores genéticos no desenvolvimento da psoríase (NESTLE; KAPLAN; *et al.*, 2009).

Estudos populacionais têm demonstrado evidências das bases genéticas da psoríase, tais como: elevada incidência familiar (até 36%), variação de incidência de casos na prole (de 8 a 16% quando apenas um dos pais é afetado pela doença e de até 41% quando ambos são afetados) e concordância quanto à presença de psoríase, que varia de 35 a 73% em gêmeos monozigóticos e de 12 a 20% entre gêmeos dizigóticos

(DUFFIN *et al.*, 2010; GRIFFITHS; BARKER, 2007; GUDJONSSON; ELDER, 2007; PERERA *et al.*, 2012).

A ausência de concordância total entre gêmeos monozigóticos e a falta de um padrão claro de herança familiar sugerem que a etiologia da psoríase é multifatorial, sendo influenciada por diversos fatores genéticos e ambientais. Portanto, cada gene relacionado à patologia exerce, individualmente, uma pequena contribuição para o desenvolvimento dessa doença (BOWCOCK; KRUEGER, J., 2005; FELETAR *et al.*, 2008; NESTLE; KAPLAN; *et al.*, 2009)

Atualmente, estão identificados dez segmentos, *loci* ou genes, associados com a susceptibilidade à psoríase. Dentre essas regiões, denominadas *PSORS* (*psoriasis susceptibility*), está a região *PSORS1*, localizada no cromossomo 6p21, considerada o maior determinante genético da psoríase. Essa região corresponde ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), onde estão os genes que codificam os Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (FELETAR *et al.*, 2008; NESTLE; KAPLAN; *et al.*, 2009).

Análises de sequências gênicas da região *PSORS1* têm associado o gene *HLA-C* com a ocorrência da doença. Dados demonstram que mais de 60% dos pacientes possuem o alelo *HLA-Cw*0602*, e que isso está associado a um risco 20 vezes maior de desenvolver a doença. Quando comparados aos indivíduos heterozigotos para esse alelo, os indivíduos homozigotos têm cinco vezes mais chances de desenvolver a psoríase (BOWCOCK; KRUEGER, J., 2005; FELETAR *et al.*, 2008; GRIFFITHS; BARKER, 2007; NESTLE; KAPLAN; *et al.*, 2009; PERERA *et al.*, 2012).

A partir de estudos decorrentes da análise dessas associações e as suas correlações com dados epidemiológicos e clínicos, foi sugerida uma classificação para a doença: psoríase tipo I, indivíduos com a presença do alelo *HLA-Cw*0602*, associada com pacientes mais jovens (menos de 30 anos), com histórico familiar positivo para a doença; e, psoríase tipo II, indivíduos sem a presença do alelo *HLA-Cw*0602*, associada com pacientes mais velhos (mais de 40 anos), sem histórico familiar para a doença e associada com comprometimento das articulações (DI MEGLIO, *et al.*, 2011)

Acredita-se que, em indivíduos pré-dispostos geneticamente, células e mediadores químicos, presentes na derme e na epiderme, envolvidos com a manutenção da barreira protetora, podem ser

desregulados em resposta a estímulos ambientais ou a antígenos próprios, gerando inflamação e desencadeando a psoríase (DUFFIN *et al.*, 2010; MEGLIO, DI *et al.*, 2011; PERERA *et al.*, 2012).

O início da doença e a gravidade dos sintomas têm sido associados a diferentes fatores ambientais, como por exemplo: traumas físicos (tatuagens, fraturas ou cirurgias); infecções virais (HIV, Hepatite C); infecções bacterianas (como as faringites causadas por estreptococos β -hemolíticos); uso contínuo de medicamentos, como antidepressivos (lítio), antihipertensivos (β -bloqueadores) e terapias anticitocinas (IFN α , para tratamento de Hepatite C e de melanoma); hábito de fumar e consumo de álcool (BOWCOCK; KRUEGER, J., 2005; GRIFFITHS; BARKER, 2007; PERERA *et al.*, 2012).

Existem, ainda, evidências de que a psoríase é uma doença autoimune. No entanto, até o momento, não foram identificados nenhum autoantígeno ou célula T autorreativa aos quais o organismo reaja nessa patologia. Apesar disso, dados recentes sugerem que a autotolerância, na patogênese da doença, é quebrada quando um DNA ou um RNA próprios dão início a cascatas de citocinas pró-inflamatórias (DUNPHY; GARDINER, 2011; ROBERSON; BOWCOCK, 2010).

1.2 A PATOGÊNESE DA PSORÍASE

Durante muito tempo, acreditou-se que a psoríase era unicamente uma doença de pele caracterizada por uma hiperproliferação dos queratinócitos da epiderme e pela dilatação e proliferação dos vasos sanguíneos (angiogênese). A resposta inflamatória cutânea, dada pela infiltração de leucócitos na derme e na epiderme, era considerada um evento secundário. Entretanto, nos últimos anos, observações clínicas e científicas têm demonstrado que as respostas do sistema imune têm um papel fundamental no início e na manutenção das lesões psoriásicas (CARDILI, R. *et al.*, 2010; DUNPHY; GARDINER, 2011; GRIFFITHS; BARKER, 2007; HUEBER; MCINNES, 2007; NESTLE; KAPLAN; *et al.*, 2009).

Algumas evidências como: a presença de expansão clonal de células T em lesões de pacientes com psoríase; os benefícios obtidos com terapias específicas anti-células T em modelos de ratos (DI MEGLIO *et al.*, 2011) além de observações clínicas como: a cura da psoríase após um transplante de medula óssea entre um receptor com a doença e um doador saudável e a observação inversa, o

desenvolvimento da psoríase também após um transplante de medula óssea, mas, dessa vez, entre um receptor saudável e um doador com a doença passaram a apontar uma importante participação do sistema imune nessa patologia (DI MEGLIO *et al.*, 2011; DUNPHY; GARDINER, 2011).

A partir de constatações como essas, a psoríase passou a ser considerada uma patologia crônica mediada pelo sistema imune. Nessa doença, as manifestações clínicas e histológicas da pele são decorrentes de interações desreguladas entre as células da epiderme e os componentes das respostas imunes. Essas interações são processos dinâmicos e os diferentes componentes celulares e mediadores químicos envolvidos estão, provavelmente, relacionados aos estágios de iniciação, progressão, manutenção e remissão da doença (NESTLE; MEGLIO, DI; *et al.*, 2009; PERERA *et al.*, 2012).

Através de análises imuno-histológicas, é possível observar a presença de diferentes componentes celulares nas lesões psoriásicas como, por exemplo: queratinócitos, células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, células *natural killer* (NK) e linfócitos B e T. Esses tipos celulares, na sua maioria, são os mesmos envolvidos nos processos de cicatrização da pele de indivíduos saudáveis. Devido a essas semelhanças, muitos pesquisadores consideram que as lesões da psoríase representam um processo prolongado de cicatrização da pele (NESTLE *et al.*, 2009; PERERA *et al.*, 2012).

Embora a ideia de a psoríase ser somente uma doença de pele ter sido afastada, é evidente que as células residentes na pele desempenham um papel importante na patogênese da doença. Acredita-se, por exemplo, que os queratinócitos, principais constituintes da epiderme, tenham grande participação no recrutamento e na ativação das células imunes (GRIFFITHS; BARKER, 2007; PERERA *et al.*, 2012).

Os queratinócitos são células efetoras capazes de responder a um estímulo de maneira rápida, mas não específica. Essas células produzem citocinas pró-inflamatórias (como, por exemplo, IL1, IL6 e TNF α) que estimulam a migração de células da corrente sanguínea para os tecidos. Além disso, embora não sejam células apresentadoras de antígenos clássicas (APCs), os queratinócitos podem processar e apresentar antígenos, ainda não identificados, para os linfócitos T, ativando essas células e dando início à expansão clonal e a secreção de anticorpos por células B (NESTLE *et al.*, 2009).

Os linfócitos T ativados migram para a pele e também secretam citocinas que, por sua vez, estimulam outras células a liberar mediadores inflamatórios aos quais os queratinócitos respondem. Esse ciclo de respostas pode estar relacionado com a indução do desenvolvimento de algumas das características da psoríase, com o desencadeamento da expressão de moléculas de adesão em células imunes e com a estimulação ainda maior da produção de citocinas pelos próprios queratinócitos, fatores que contribuem para a manutenção do estado ativo da doença (FELETAR *et al.*, 2008; NESTLE *et al.*, 2009).

Além dos queratinócitos, as células dendríticas (dérmicas, plasmocitóides e células de Langerhans) atuam como APCs, reconhecendo e capturando antígenos para a ação das células B e T. As células dendríticas estão presentes em grande número nas lesões psoriásicas, produzindo e secretando citocinas (como, por exemplo, IL12, IL23, TNF α e IFN γ) que podem estimular outros aspectos da resposta imune como a ativação do NF κ B, a migração de leucócitos e vasodilatação (FELETAR *et al.*, 2008; NESTLE *et al.*, 2009).

As lesões psoriásicas são caracterizadas pela presença de infiltrados de células T ativadas. Na camada da derme dessas lesões são encontradas, principalmente, células T CD4, enquanto na camada da epiderme é observada a presença predominante de células T CD8, o que demonstra que essas células têm uma importante contribuição na resposta imune a essa patologia. No entanto, a presença e a ação de outros subtipos de células T, como células T *helper* 1 (Th1) e Th17, estão sendo amplamente estudadas (HUEBER; MCINNES, 2007; DI MEGLIO *et al.*, 2011; NESTLE *et al.*, 2009).

Apesar da destacada importância das células T na imunopatogênese da psoríase, nos últimos anos, a atuação dos constituintes da resposta imune inata no desenvolvimento e na manutenção da doença também tem sido investigada. Neutrófilos e macrófagos são, por exemplo, encontrados na epiderme dos pacientes e, como essas células de função fagocitária têm vida curta (aproximadamente três dias), a sua presença na epiderme está relacionada, provavelmente, a um recrutamento contínuo para o local das lesões (NESTLE *et al.*, 2009).

Assim como neutrófilos e macrófagos, as células NK estão presentes nas lesões psoriásicas. Essas células possuem atividade citotóxica e também estão relacionadas com a secreção de citocinas pró-

inflamatórias e com a ativação de outros tipos celulares nessa patologia (DUNPHY; GARDINER, 2011).

A presença dessa variedade celular nas lesões psoriásicas sugere uma complexa participação do sistema imune na patogênese da psoríase. O importante papel desses diferentes tipos celulares é evidenciado pela descoberta de novos alvos terapêuticos, relacionados à ação dessas células, que são efetivos para o tratamento da doença (NESTLE *et al.*, 2009).

1.3 A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

As células, anteriormente descritas, que participam da patogênese da psoríase, possuem receptores de membrana específicos que interagem com as moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). Essas interações resultam na ativação ou na inibição da atividade de células da resposta imune.

A primeira descrição do MHC, ocorrida em 1936, foi resultado de estudos de transplantes de tecidos realizados em camundongos (CHESLEY; DUNN, 1936). Posteriormente, em humanos, essas proteínas foram relacionadas com a rejeição aguda de órgãos após transplantes e com a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD, do inglês *graft-versus-host-disease*) após alguns transplantes de medula óssea (PARHAM *et al.*, 2012). Essas associações revelaram uma participação das glicoproteínas codificadas por esse grupo gênico na identificação do próprio, o que foi denominado de histocompatibilidade. Até que, em 1975, Doherty e Zinkernagel vincularam as moléculas MHC com a apresentação de antígenos (DOHERTY; ZINKERNAGEL, 1975).

Essas glicoproteínas têm a função de ligar-se a fragmentos de peptídeos e apresentá-los na superfície celular. Os peptídeos que serão apresentados, através do MHC, podem ser provenientes de duas origens: (1) intracelular, os peptídeos são resultado da síntese celular e ligam-se às moléculas MHC de Classe I; ou (2) exógena, os fragmentos de peptídeos são resultantes de uma atividade proteolítica e ligam-se às moléculas MHC de classe II. Esses diferentes tipos de MHC participam, portanto, tanto da apresentação de antígenos externos quanto de antígenos próprios (CHAPLIN, 2010; NEEFJES *et al.*, 2011; UJVARI; BELOV, 2011).

As moléculas MHC de Classe I são constituídas por uma pesada cadeia polimórfica transmembranar, formada por três domínios globulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ que estão associados, de maneira não covalente, a uma cadeia leve, não polimórfica, a β_2 -microglobulina (β_2m) (NEEFJES *et al.*, 2011). A variedade de moléculas MHC é decorrente dos polimorfismos da cadeia pesada e, como resultado disso, apresentam diferenças estruturais na fenda de ligação dos peptídeos. Os diferentes polimorfismos observados asseguraram que as respostas imunes pudessem ser geradas contra um diversificado repertório de antígenos (CAMPBELL *et al.*, 2012; CHAPLIN, 2010; LI; RAGHAVAN, 2010).

Em humanos, o MHC foi nomeado de Complexo de Histocompatibilidade Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*), pois essas moléculas são expressas pelos leucócitos, mas não pelos eritrócitos. O MHC humano refere-se ao conjunto gênico localizado no braço curto do cromossomo 6, mais precisamente, na posição 6p.21.3, que ocupa uma região cromossômica de cerca de 3,6 megabases de DNA onde estão localizados mais de 200 genes (Figura 1). Por outro lado, o gene codificador da β_2m está localizado no cromossomo 15 (CASTELLI *et al.*, 2011; PARHAM *et al.*, 2012).

A região genômica do MHC está subdividida, de acordo com a diversidade genética, a expressão, a estrutura e as funções dos seus produtos moleculares, em três regiões: classes I, II e III. A região MHC de classe I é constituída por pseudogenes (*HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*) e por genes codificadores para dois grupos de moléculas HLA: (1) as clássicas ou Ia, moléculas altamente polimórficas, onde se incluem as moléculas HLA-A, HLA-B e HLA-C; e (2) as não-clássicas ou Ib, moléculas com um polimorfismo limitado, mais conservadas, onde estão incluídas as moléculas HLA-E, HLA-F e HLA-G, sendo, os polimorfismos dessa última molécula, o foco desse estudo. A região MHC de classe II possui genes que codificam moléculas expressas somente na superfície de APCs, enquanto que, a região MHC de classe III possui genes que codificam moléculas com outras funções imunes como os componentes do complemento e citocinas (CAROSELLA, E.; FAVIER; *et al.*, 2008; CASTELLI *et al.*, 2009; PARHAM *et al.*, 2012; UJVARI; BELOV, 2011).

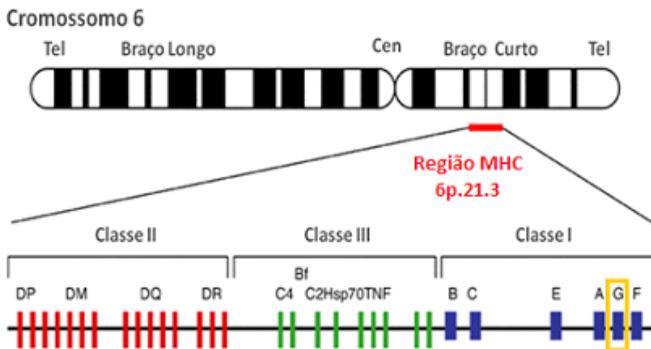


Figura 1: O MHC Humano. A localização do MHC humano no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes dentro das classes II, III e I, em amarelo, está destacado, o locus HLA-G (adaptado de Cambridge Journals, 2012).

1.4 HLA-G: O GENE E A MOLÉCULA

Em condições saudáveis, o gene *HLA-G* tem sua expressão restrita a alguns tecidos, como por exemplo: tecidos fetais, estando presente nos trofoblastos; e, tecidos adultos, sendo detectado na medula tímica, na córnea, nas ilhotas pancreáticas e em precursores endoteliais e eritróides (CASTELLI *et al.*, 2011; MOREAU *et al.*, 2009). Contudo, a expressão do *HLA-G* pode ser induzida em algumas situações específicas, como por exemplo, transplantes, tumores, infecções virais e doenças autoimunes e inflamatórias (CAROSELLA *et al.*, 2008).

Tanto nesses casos quanto nas condições saudáveis, as moléculas HLA-G interagem com determinados receptores de membrana, presentes em diversos tipos celulares, promovendo respostas do sistema imune. Os três receptores, atualmente descritos, relacionados à atividade do HLA-G são: os receptores de leucócitos semelhantes às imunoglobulinas, ILT2 (ILT2/CD85j/LILRB1) e ILT4 (ILT4/CD85d/LILRB2) e o receptor de célula NK semelhante à imunoglobulina, KIR2DL4 (KIR2DL4/ CD158d) (CAMPBELL *et al.*, 2012; MOREAU *et al.*, 2009).

O receptor ILT2 é expresso por linfócitos B, linfócitos T, células NK, células dendríticas, monócitos e macrófagos. O receptor ILT4, por outro lado, é especificamente mielóide, sendo expresso somente por

células dendríticas, monócitos e macrófagos. O receptor KIR2DL4 tem sua expressão limitada à subpopulação de NK CD56^{bright}, células essas que constituem uma pequena parcela das células NK periféricas (CAROSELLA *et al.*, 2008; DONADI *et al.*, 2011).

Os receptores ILT2 e ILT4 possuem, claramente, atividade inibitória da resposta celular. Em contrapartida, o receptor KIR2DL4 é um membro incomum da família de receptores semelhantes a imunoglobulinas, pois tem a capacidade de enviar tanto sinais inibidores quanto ativadores para as células NK e NKT. Esse imunoreceptor é constituído por um motivo inibidor baseado em tirosina (ITIM) na sua cauda citoplasmática, para o sinal inibitório, e uma arginina carregada positivamente na região transmembranar, necessária para o sinal ativador e a sua ligação com o HLA-G ocorre através do domínio $\alpha 1$. Outra diferença existente entre o receptor KIR2DL4 e os receptores ILT é que, enquanto que o HLA-G é o único ligante de KIR2DL4, os receptores ILT2 e o ILT4 ligam-se, também, a outras moléculas HLA clássicas. Apesar dessa característica, o HLA-G possui uma alta afinidade de ligação com os receptores ILT2 e ILT4. Sendo que, enquanto os receptores ILT2 ligam-se somente ao domínio $\alpha 3$ associado à β_2m , os receptores ILT4 reconhecem o domínio $\alpha 3$ livre (CASTELLI *et al.*, 2010; DONADI. *et al.*, 2011; PARHAM *et al.*, 2012).

Esses três receptores são expressos de maneira diferenciada por cada um dos tipos celulares descritos, e os efeitos das suas interações com o HLA-G têm sido demonstrados. O HLA-G pode inibir, por exemplo, as funções citolíticas das células NK; a maturação de células dendríticas; as funções citolíticas antígenos-específicas das células T CD8, as respostas aloproliferativas das células T CD4; a produção de citocinas por células T, além de induzir a apoptose celular (DONADI. *et al.*, 2011).

O HLA-G tem a capacidade de atuar diretamente na atividade das células participantes da resposta imune. Essa característica tem feito dessa molécula um alvo atrativo de estudos para a compreensão dos mecanismos de diversas situações clínicas como, por exemplo: gravidez e suas complicações, transplantes, cânceres, infecções virais e doenças inflamatórias e autoimunes (CAROSELLA *et al.*, 2008; CAROSELLA *et al.*, 2011; DONADI *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, uma dessas situações clínicas em que o HLA-G tem sido estudado é na patogênese da psoríase. Nos pacientes

portadores dessa patologia, foi observada, na pele, a presença de HLA-G, entretanto, até o momento, essa molécula não foi descrita na pele de controles saudáveis (CARDILI, R. *et al.*, 2010; UROSEVIC, 2007). Nos pacientes com psoríase, as principais células que expressam o *HLA-G* são os macrófagos presentes nas junções dermoepidérmicas. Essa distribuição das células que expressam *HLA-G* está de acordo com a atual visão da patogênese da psoríase, na qual os queratinócitos produzem determinados tipos de citocinas e quimiocinas, alguns dos quais são capazes de provocar o aumento da expressão do *HLA-G*. Estes achados levam à suposição de que os macrófagos que expressam *HLA-G* podem representar um sistema de controle interno para neutralizar células T autoreativas que expressam receptores cognatos para HLA-G (MENIER *et al.*, 2010; UROSEVIC, 2007).

1.4.1 Histórico

Em 1987, foi descrito e clonado o gene codificador de uma molécula atípica HLA de Classe I, cuja proteína havia sido identificada na linhagem celular de coriocarcinoma BeWo (VAN DER VEN *et al.*, 2000; MOREAU *et al.*, 2009). Esta molécula, também detectada em trofoblastos de placentas, apresentava uma cadeia H, de aproximadamente 40kDa, e parecia não ser polimórfica (VAN DER VEN *et al.*, 2000; MOREAU *et al.*, 2009). No entanto, somente em 1990, essa nova molécula HLA de Classe I, encontrada em quantidades abundantes na interface materno-fetal, foi reconhecida e denominada como o HLA-G (CAROSELLA *et al.*, 2008; LARSEN; HVIID, 2009; MOREAU *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado o papel crucial do HLA-G na implantação e na manutenção da imunotolerância materno-fetal durante a gravidez. Além disso, a participação do HLA-G também tem sido observada e estudada em outras situações clínicas como, por exemplo: na aceitação de órgãos transplantados e no escape imunológico de tumores e células infectadas por vírus (CAROSELLA *et al.*, 2008; CASTELLI *et al.*, 2011; LARSEN; HVIID, 2009; MOREAU *et al.*, 2009).

1.4.2 Estrutura do gene

Como dito anteriormente, o gene codificador para o HLA-G está localizado na região p21.3 do cromossomo 6. A estrutura gênica do

HLA-G consiste em 4396pb, divididos em sete *introns* e oito *exons* (Figura 2) (CASTELLI *et al.*, 2011; DONADI *et al.*, 2011; MOREAU *et al.*, 2009).



Figura 2: O mRNA primário do gene *HLA-G*. A estrutura molecular do mRNA primário do *HLA-G*, na qual estão identificados os oito *exons*, o *codon* de parada no *exon* 6 e dois *introns*, i2 e i4 (adaptado de CAROSELLA *et al.*, 2008).

O *exon* 1 codifica o peptídeo sinal, os *exons* 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, respectivamente, e o *exon* 5 codifica o domínio transmembranar. O *exon* 6 codifica a cauda citoplasmática dessa molécula, mas a presença de um códon de parada (UGA), no segundo códon desse *exon*, resulta em cauda citoplasmática mais curta em comparação com as moléculas de HLA I clássicas. O *exon* 7 é sempre ausente no RNA mensageiro maduro (mRNA), removido durante o mecanismo de *splicing*. E, devido ao códon de parada no *exon* 6, o *exon* 8 não é traduzido, sendo este último segmento considerado a região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA (DONADI *et al.*, 2011; LARSEN; HVIID, 2009; MOREAU *et al.*, 2009).

A definição dos oito exons e sete introns que compõem a molécula de mRNA do gene *HLA-G* foi baseada, inicialmente, no produto transcrito de outros HLAs clássicos. Uma vez que estudos de similaridade, em humanos, demonstraram que o *HLA-G* possui, aproximadamente, 86% de semelhanças com as sequências consenso dos genes das moléculas MHC de Classe I clássicas: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (DONADI *et al.*, 2011; MOREAU *et al.*, 2009). Os dados inicialmente obtidos sugeriam que o *HLA-G* tinha uma estrutura similar ao *HLA-A2*. Porém, após a realização de análises cristalográficas foi possível perceber que, dentre todas as moléculas HLA de Classe I, clássicas e não clássicas, a maior semelhança do *HLA-G* é com o *HLA-E* e não com *HLA-A2* (FAVIER *et al.*, 2007).

1.4.3 Estrutura da molécula

O transcrito primário do *HLA-G* pode gerar, através de *splicing* alternativo, sete mRNAs alternativos que codificam isoformas da proteína ligadas à membrana (*HLA-G1*, *G2*, *G3* e *G4*) e isoformas da

proteína solúveis (HLA-G5, G6 e G7) (Figura 3) (CAROSELLA *et al.*, 2008; DONADI *et al.*, 2011).

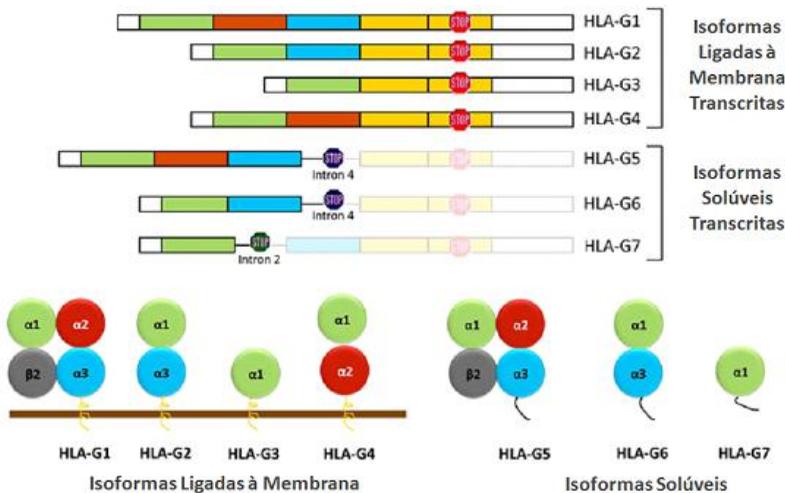


Figura 3: As sete isoformas da molécula HLA-G produzidas por *splicing* alternativo. As isoformas solúveis são geradas por excisão de um ou dois *exons* que codificam domínios globulares, enquanto que a tradução do *intron* 2 ou do *intron* 4 produz isoformas solúveis, que não possuem o domínio transmembranar (adaptado de DONADI *et al.*, 2011).

A molécula HLA-G1 é a isoforma completa da proteína. Essa isoforma, ligada à membrana, apresenta uma estrutura extracelular semelhante às moléculas HLA de Classe I clássicas: uma cadeia pesada formada pelos três domínios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) associados, de maneira não covalente, a β_2m . A isoforma HLA-G2, por outro lado, não possui o domínio $\alpha 2$, codificado pelo *exon* 3. O HLA-G3 não apresenta os domínios $\alpha 2$ e $\alpha 3$, codificados, respectivamente, pelos *exons* 3 e 4. A molécula HLA-G4, por sua vez, não possui o domínio $\alpha 3$, codificado pelo *exon* 4 (DONADI *et al.*, 2011; MOREAU *et al.*, 2009).

As isoformas solúveis HLA-G5 e HLA-G6 apresentam os mesmos domínios globulares de HLA-G1 e HLA-G2, respectivamente, e são produzidas devido a transcrição do *intron* 4, o qual bloqueia a transcrição do domínio transmembranar que é codificado pelo *exon* 5. Nessas duas isoformas solúveis, a região 5' do *intron* 4 é transcrita até a geração de um códon de parada, gerando uma cauda de 21 aminoácidos

que implica na solubilidade dessas moléculas. A isoforma HLA-G7 tem somente o domínio $\alpha 1$ e, este está ligado a dois aminoácidos codificados pelo *intron 2*, que é retido nessa transcrição (DONADI *et al.*, 2011; MOREAU *et al.*, 2009).

Apesar das funções das isoformas ainda serem pouco compreendidas, tem sido proposto que elas podem estar envolvidas na modulação da resposta imune em diversas situações fisiológicas. A produção das diferentes isoformas de HLA-G é direcionada por mecanismos de regulação e, dependendo da situação fisiológica e do tipo celular envolvido, algumas isoformas são expressas e outras não (CAMPBELL *et al.*, 2012).

A expressão dessas isoformas está relacionada à capacidade de diferentes tipos celulares responderem a fatores microambientais, que incluem fatores endógenos: estresse, privação de nutrientes, hormônios e citocinas como, por exemplo, o Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF), IFNs, IL-10, Fator de Necrose Tumoral α (TNF α), Fator de Necrose Tumoral β (TGF β) e o Fator de Crescimento Epidermal (EGF); e fatores exógenos como, por exemplo, fármacos. Esses fatores, aliados aos polimorfismos do *HLA-G*, podem regular a expressão desse gene tanto no nível transcricional, quanto no nível pós-transcricional (CAROSELLA *et al.*, 2011).

1.4.4 Nomenclatura dos Alelos de HLA-G

Quando comparado aos genes de HLA de Classe I clássicos, o *locus HLA-G* apresenta uma baixa diversidade de alelos. Apesar disso, a nomenclatura dos novos alelos que estão sendo descobertos segue a padronização apresentada pelo *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* (HLA NOMENCLATURE, 2012A). Atualmente, de acordo com essa padronização, os nomes dos alelos podem ser compostos de quatro, seis ou oito dígitos (Figura 4).

Os dois primeiros dígitos referem-se à família do alelo, e o terceiro e o quarto dígitos referem-se à ordem em que as sequências foram relatadas (ex: *HLA-G*01:01* e *HLA-G*01:02*). Portanto, um alelo que difere nesses quatro primeiros dígitos deve ter, pelo menos, uma substituição nucleotídica não sinônima, que modifica a sequência de aminoácidos da proteína codificada (DONADI *et al.*, 2011; LARSEN; HVIID, 2009).

Por outro lado, os alelos que possuem variações silenciosas na sequência codificadora, não produzindo, portanto, modificações na sequência de aminoácidos da proteína codificada, são diferenciados pelo uso do quinto e sexto dígitos (ex: *HLA-G*01:04:01* e *HLA-G*01:04:04*). O sétimo e oitavo dígitos são utilizados para distinguir sequências nucleotídicas observadas em *introns* ou nas regiões não traduzidas 3' ou 5' (ex: *HLA-G*01:01:01:04* e *HLA-G*01:01:01:05*) (DONADI *et al.*, 2011).

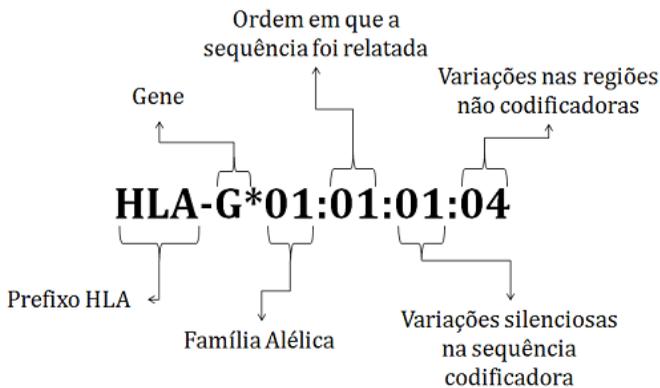


Figura 4: Nomenclatura dos Alelos de *HLA-G*. Padronização da nomenclatura dos alelos *HLA-G* de acordo com o *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* (adaptado de HLA NOMENCLATURE, 2012A).

1.4.5 Polimorfismos do *HLA-G*

Quando comparado com os genes de HLA de Classe I clássicos, que possuem centenas de alelos, o *locus HLA-G* apresenta um baixo número de variantes. Atualmente, estão listados no *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*, 50 alelos, que codificam 16 proteínas funcionais distintas e dois alelos nulos (DONADI *et al.*, 2011; HLA NOMENCLATURE, 2012A; LARSEN; HVIID, 2009). Esses números contrastam com os genes HLA clássicos, como, por exemplo, o *HLA-A* e *HLA-B*, que apresentam 1884 e 2490 alelos, respectivamente (HLA NOMENCLATURE, 2012B).

As frequências dos diferentes alelos *HLA-G* variam entre as diferentes populações étnicas. Dos alelos relatados, somente cinco são observados em populações do mundo todo. Dentre esses, o grupo

*G*010101* (com cinco alelos) é o predominante e tem frequências que variam entre 32 e 82% nas populações japonesas, caucasianas e africanas (LARSEN; HVIID, 2009; MOREAU *et al.*, 2009).

Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) definem o maior grupo de alelos *HLA-G*. Contudo, a maioria das mutações desse gene é silenciosa e gera poucas são as mutações que geram mudanças de aminoácidos na proteína *HLA-G*. A partir dessas modificações são definidas 16 proteínas variantes (*HLA-G*01:01*, **01:02*, **01:03*, **01:04*, **01:06*, **01:07*, **01:08*, **01:09*, **01:10*, **01:11*, **01:12*, **01:14*, **01:15*, **01:16*, **01:17* e **01:18*)(CAMPBELL *et al.*, 2012; LARSEN; HVIID, 2009; HLA NOMENCLATURE, 2012C; MOREAU *et al.*, 2009).

Os dois alelos nulos do gene *HLA-G* são resultantes de mutações de *exons* que geram uma parada precoce da transcrição. O alelo *G*01:05N*, possui uma deleção no códon 130, dentro do *exon 3*, que causa uma alteração na sequência e, por consequência, a parada prematura da transcrição no códon 171. O alelo *G*01:13N*, por sua vez, apresenta uma mutação pontual no códon 54, no *exon 2*, que, também, gera um códon de parada prematuro (LARSEN; HVIID, 2009).

Como dito anteriormente, as 5'URR e 3'UTR possuem um grau relativamente alto de variações nucleotídicas (DONADI *et al.*, 2011). Na região promotora de *HLA-G* haviam sido identificados, até 2011, 29 SNPs (CASTELLI *et al.*, 2011). Essas variações podem estar implicadas, diretamente, na regulação da expressão desse gene, uma vez que, muitos desses polimorfismos estão dentro ou próximos de conhecidos ou supostos elementos reguladores da transcrição (MOREAU *et al.*, 2009).

A região 3'UTR, por outro lado, possui oito sítios polimórficos descritos: um polimorfismo de presença (In, inserção) ou ausência (Del, deleção) de um fragmento de 14pb (14pb InDel) e sete SNPs (+3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G e +3196 G/C). Pelo menos três desses sítios polimórficos foram associados à regulação dos níveis de expressão do *HLA-G*: (1) o polimorfismo de 14pb InDel; (2) a presença de uma guanina na posição +3142 G/C; (3) a presença de uma adenina na posição +3187 A/G (LARSEN; HVIID, 2009; MENIER *et al.*, 2010; MOREAU *et al.*, 2009). Os haplótipos identificados na população brasileira para essa região, levando em consideração os oito polimorfismos citados

anteriormente, estão descritos na Tabela 1 (CASTELLI *et al.*, 2010; LUCENA-SILVA *et al.*, 2012).

Embora o polimorfismo 14pb InDel possa estar associado com o controle da produção de HLA-G, modulando a estabilidade do mRNA, os mecanismos que estão envolvidos nesse processo ainda não estão bem elucidados. Os alelos que apresentam a inserção da sequência de 14pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') estão sendo associados, em células de trofoblastos, com uma produção mais baixa dessa molécula, tanto para as isoformas solúveis como para as isoformas ligadas à membrana. Por outro lado, uma fração dos mRNAs que apresentam a inserção de 14pb pode ser adicionalmente processada, por *splicing* alternativo, ocorrendo a remoção de 92 bases do RNAm maduro. Esse processo resulta em transcritos de HLA-G menores, os quais têm sido relatados como formas mais estáveis da molécula do que os mRNAs completos (DONADI *et al.*, 2011).

Tabela 1: Frequências dos haplótipos da 3'UTR do gene *HLA-G* no Brasil.

Haplótipo	Frequência 1*	Frequência 2**	Frequência 3**
UTR1 - DelTGCCCGC	0,2580	0,2953	0,2581
UTR2 - InsTCCCAG	0,2420	0,2283	0,2419
UTR3 - DelTCCCAG	0,1260	0,1575	0,1258
UTR4 - DelCGCCAC	0,1320	0,0669	0,1323
UTR5 - InsTCCTGAC	0,0930	0,0866	0,0935
UTR6 - DelTGCCAC	0,0680	0,0866	0,0677
UTR7 - InsTCATGAC	0,0550	0,0354	0,0548
UTR8 - InsTGCCGAG	0,0130	0,0000	0,0129
UTR9 - InsTGCTGAC	0,0000	0,0000	0,0065
UTR10 - DelTCCCAG	0,0000	0,0000	0,0032
UTR11 - DelC CCCGAC	0,0000	0,0000	0,0032
UTR13 - DelTCCTGAC	0,0000	0,0039	0,0000
UTR14 - DelTGCCGGC	0,0000	0,0118	0,0000
UTR15 - InsTCCCAG	0,0000	0,0236	0,0000
UTR16 - InsTCCTGAG	0,0000	0,0039	0,0000
Outros	0,0130	0,0000	0,0000

*Frequências descritas em Castelli *et al.*, 2010, onde Frequência 1 representa as frequências obtidas para cada haplótipo na população brasileira.

**Frequências descritas em Lucena-Silva *et al.*, 2012, onde Frequência 2 representa as frequências dos haplótipos na região norte do Brasil, enquanto que Frequência 3 representa as frequências dos haplótipos na região sul do país.

A presença da guanina na posição +3142 pode influenciar a expressão do *locus* HLA-G pelo aumento da afinidade dessa região com

os microRNAs miR-148a, miR-148b e miR-152, diminuindo assim a disponibilidade de mRNA pela degradação e pela supressão da tradução (MOREAU *et al.*, 2009).

A presença da adenina na posição +3187 está associada com a redução da estabilidade do mRNA e pode levar a uma redução da expressão de HLA-G. Essa associação está relacionada ao fato que esse SNP está localizado próximo a um motivo rico em AU que medeia a degradação de mRNA (DONADI *et al.*, 2011; MENIER *et al.*, 2010; MOREAU *et al.*, 2009).

Essas variabilidades nucleotídicas das regiões promotora e 3'UTR podem influenciar, portanto, os níveis de HLA-G através da modificação da afinidade das sequências-alvos do gene por fatores transcricionais ou pós-transcricionais. Da mesma forma, os polimorfismos da região codificadora podem produzir mudanças conformacionais nas moléculas de HLA-G, que, por sua vez, podem resultar em modificações das suas principais funções como, por exemplo: a interação com receptores celulares, a produção de isoformas, a modulação da resposta imune e a capacidade de se ligar a peptídeos (DONADI *et al.*, 2011).

Dependendo a situação fisiológica ou clínica, a expressão de HLA-G pode ser benéfica ou prejudicial ao organismo. Em condições patológicas, nas quais uma resposta imune vigorosa e prolongada é necessária, a expressão de HLA-G é prejudicial, como nos casos de câncer e nas doenças virais crônicas. Opostamente a isso, nos casos em que uma resposta imune vigorosa é indesejável, a presença de HLA-G é vantajosa, como nos casos de transplantes e de doenças autoimunes (DONADI *et al.*, 2011).

Dentre os polimorfismos da 3'UTR que estão relacionados a doenças, foram identificadas associações da inserção de 14pb nos casos de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), falhas de fertilizações *in vitro*, rejeições agudas de transplantes renais, pré-eclâmpsia e abortos espontâneos recorrentes. Além disso, a presença do polimorfismo de 14pb em heterozigose (In/Del) está associada com índices mais baixos da atividade da doença nos casos de LES e a deleção dos 14pb está associada com artrite idiopática juvenil (CASTELLI *et al.*, 2010; LARSEN; HVIID, 2009).

Apesar de várias patologias e situações clínicas serem associadas aos polimorfismos do gene *HLA-G*, incluindo os polimorfismos da

3'UTR, as relações das variações dessa molécula com os casos de psoríase ainda não são conhecidas. No entanto, a possibilidade de encontrar uma associação de susceptibilidade genética, aliada a fatores ambientais, que desencadeia a resposta imune alterada dessa patologia, poderia prover novas ferramentas de prognóstico ou, até mesmo, novos alvos terapêuticos para auxiliar no tratamento dos indivíduos que são acometidos por essa doença.

2 JUSTIFICATIVA

As interações entre a molécula HLA-G e determinados receptores celulares produzem efeitos inibitórios na atividade de algumas células e, conseqüentemente, uma redução da resposta imune (CAROSELLA *et al.*, 2011; CAROSELLA *et al.*, 2008). Considerando-se essa característica da molécula HLA-G, de modular a função de algumas células, a sua expressão em patologias inflamatórias crônicas, como é o caso da psoríase, poderia promover um efeito inibitório da resposta imune, auxiliando, dessa forma, na redução do processo inflamatório dessas doenças.

A partir de informações como essas, verifica-se a importância da realização de maiores estudos sobre a psoríase, para uma melhor compreensão da patogênese dessa doença e a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos.

As variações da expressão do gene *HLA-G*, por exemplo, que podem ser decorrentes de polimorfismos do gene, têm sido relacionadas a diversas condições patológicas, como: infecções virais crônicas, tumores, doenças autoimunes e doenças inflamatórias (DONADI *et al.*, 2011; LARSEN; HVIID, 2009). Para essas últimas, dentre as quais está incluída a psoríase, tem sido proposto que a expressão do *HLA-G* é um possível mecanismo de proteção tecidual contra respostas inflamatórias (CONSIGLIO *et al.*, 2011). No entanto, até o momento, não existem estudos que relacionem polimorfismos do gene *HLA-G* com a ocorrência de psoríase. Diante disso, torna-se interessante avaliar se a variabilidade desse gene pode estar relacionada ao desenvolvimento da psoríase na população brasileira.

Tendo como hipótese que pacientes e controles apresentam diferentes haplótipos de 3'UTR e sabendo que esses diferentes haplótipos podem gerar variados níveis de expressão da molécula HLA-G, pretende-se, neste estudo, verificar quais são os haplótipos mais frequentes nesses dois grupos e correlacioná-los com as possíveis variações de expressão.

Essas associações entre a psoríase e determinados polimorfismos do gene *HLA-G* podem, no futuro, auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e no direcionamento de terapias para essa patologia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar polimorfismos da região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *HLA-G* em pacientes com psoríase, no estado de Santa Catarina, buscando um melhor entendimento da ação desse gene na patogênese da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Observar a variabilidade da 3'UTR do gene *HLA-G* em uma amostra populacional do estado de Santa Catarina.
2. Calcular as frequências alélicas e genótípicas de todos os pontos de variação encontrados na 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com psoríase e em indivíduos-controle.
3. Inferir os haplótipos envolvendo estes *loci* analisados em pacientes com psoríase e em indivíduos-controle.
4. Verificar se há associação entre os alelos, genótipos, haplótipos, dados clínicos e epidemiológicos e a doença estudada.
5. Relacionar os dados encontrados neste estudo com a patogênese da psoríase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho é parte de um projeto maior, intitulado “Estudo genético e epidemiológico em pacientes com psoríase no estado de Santa Catarina”, coordenado pela Dra Iliada Rainha de Souza e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH/UFSC) em 25 de outubro de 2010, através do parecer n° 1034/12.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 100 pacientes diagnosticados com psoríase, atendidos pelo Ambulatório de Dermatologia/Psoríase do Hospital Nereu Ramos, no período de dezembro de 2010 a novembro de 2011, e de 100 indivíduos-controles, sem diagnóstico nem histórico familiar para a patologia em estudo, que são participantes de projetos realizados paralelamente pela equipe do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) da UFSC.

Os dados epidemiológicos e familiares, dos pacientes e dos indivíduos-controles, foram obtidos através de entrevistas realizadas com questionários estruturados (Apêndices A e B), após a assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido (Apêndices C e D) pelos voluntários. Após as entrevistas, as amostras de sangue periférico (cerca de 8 ml) foram coletadas através de punção venosa, para extração do DNA genômico e obtenção dos dados genéticos, e armazenadas e transportadas a 4°C para o posterior processamento no LAPOGE.

As amostras biológicas e os questionários obtidos nessa pesquisa foram catalogados e constituem um banco de dados e amostras, de pacientes com psoríase e de indivíduos-controles, armazenado no LAPOGE.

Alguns desses dados, obtidos através dos questionários, como a idade de manifestação da psoríase e o possível acometimento das articulações (artrite psoriásica) foram utilizados para correlacionar com os dados genéticos obtidos nesse trabalho.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas (*Centrifuge 206 BL Excelsa II®*) a 3000g (1835rpm) durante 15 min a temperatura ambiente (TA), para a separação dos componentes

sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos. Esses componentes sanguíneos foram alíquotados, identificados e estocados a -20°C . Os leucócitos foram utilizados para a extração do DNA genômico. O plasma e o concentrado de hemácias não foram utilizados nesse estudo.

Reagentes e Soluções

1) Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; Sacarose 0,32M, Merck®; MgCl₂ 0,0025M; Triton X 100 – 1%, Nuclear®);

2) Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; KCl 0,05M, Vetec®); MgCl₂ 0,0025M, Nuclear®); Nonidet – 1%, Amresco®; TWEEN 20 – 1%, Amresco®);

3) SDS 10%(Amresco®);

4) Solução de Perclorato de Sódio 5,0M (Vetec®);

5) Solução Saturada de NaCl 6,0M (Nuclear®);

6) TE (Tris-HCl 1M, Amresco®; EDTA 0,5M, Vetec®);

7) Álcool Isopropílico Absoluto, TA- Temperatura Ambiente (Merck®);

8) Etanol 70%, TA (Merck®).

Procedimento

A extração de DNA foi realizada através de um método de *Salting Out* modificado, baseado em Miller *et al.* (1988). Para cada amostra, foram colocados 100 μL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5mL (tipo *ependorf*), utilizando-se uma micropipeta e ponteiros estéreis. Em seguida, adicionou-se 1,0mL Solução de Lise I em cada um desses microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (*Centrifuge 5415D*, *Eppendorf*®) a 13400g (12000 rpm) durante 4 min a TA. O sobrenadante foi descartado e, este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando a presença dos glóbulos brancos. Posteriormente, foi acrescentado ao precipitado de leucócitos 300 μL de Solução de Lise II, 10 μL de SDS 10% e 75 μL de Perclorato de Sódio 5M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos, do tipo *vórtex*, e a cada tubo foi acrescentado 130 μL de NaCl 6M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min a TA. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para esses, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300 μL

de Álcool Isopropílico Absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 13400g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300 μ L de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, a temperatura ambiente, *overnight*. Após a secagem dos precipitados, foi adicionado a cada tubo 100 μ L de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 min e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

4.4 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO INDEL DA REGIÃO 3'UTR

A genotipagem do polimorfismo InDel, de 14pb (rs1704), da região 3'UTR do gene *HLA-G* (ID:3135), foi realizada através da amplificação dessa região pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

4.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase

Reagentes e Soluções

1) Água Ultrapura;

2) dNTPs 0,2mM de cada (100mM, Invitrogen®);

3) MgCl₂ 1,5mM (50mM, Invitrogen®);

4) Tampão de PCR 10X (0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; Invitrogen®);

5) Primer Reverse 10pmol (HLAGR, 5'-GTCTTCCATTATTTTGTCTC T-3'; IDT®);

6) Primer Forward 10pmol (HLAGF, 5'-TGTGAAACAGCTGCCCTGT GT-3'; IDT®);

7) Taq DNA Polymerase Platinum (0,5U/ μ L; Invitrogen®).

Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados, em tubos de 0,6 μ L (tipo *epENDORF*): 7,40 μ L de água; 0,25 μ L de dNTPs; 0,75 μ L de MgCl₂; 3,5 μ L de Tampão de PCR; 0,5 μ L de *Primer R*; 0,5 μ L de *Primer F*; 0,10 μ L de *Taq Platinum*® e 2 μ L de DNA (em torno de 200ng). Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min e, em seguida, a 30 ciclos de: 95°C por 45s, 56°C por 45s e 72°C por

60s; e um passo de extensão final a 72°C por 7 min (Castelli *et al.*, 2010).

4.4.2 Análise do Produto Amplificado

Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura;
- 2) Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1 - 29g de acrilamida, Bioamerica®, e 1g de bis-acrilamida, Amresco®, diluídas em 100mL H₂O);
- 3) Tampão TBE 10X (Tris base 0,89M, Amresco®; Ácido Bórico 0,89M, Vetec®; EDTA 0,2M, Vetec®);
- 4) Tampão TBE 1X (100mL do Tampão TBE 10X; 900mL H₂O);
- 5) TEMED: tetrametiletilenodiamina (Amresco®);
- 6) Persulfato de Amônio 10% (Hexapur®);
- 7) Tampão de Aplicação de Amostras (900µL de Bromofenol, Merck®; 900µL Xilenocianol, Sigma-Aldrich®; 900µL TBE; 4,5mL Ficoll 30% diluído em H₂O, Sigma-Aldrich®; 1,8mL EDTA 0,5M pH 8,0, Vetec®; 3,6g Sacarose, Merck®);
- 8) Formaldeído (Amresco®);
- 9) Peso Molecular de 100pb (BioLabs®).

Procedimento

Os produtos amplificados (nos tamanhos de 345pb para as deleções e de 359pb para as inserções) foram visualizados através de eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) 7%. Estes géis foram feitos adicionando: 31,5mL de H₂O; 9mL de Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida; 4,5mL de TBE 10%; 67,5µL de TEMED e 675µL de Persulfato de Amônio 10%. Essa solução foi colocada entre as placas de vidro e, após a polimerização do gel, as placas foram encaixadas na cuba de eletroforese. As amostras foram preparadas da seguinte forma: 3,5µL de produto de PCR; 1µL de Tampão de Aplicação de Amostras e 1µL de H₂O; e, posteriormente, aplicadas no gel. No primeiro poço foi colocado o padrão de peso molecular de 100pb para, posteriormente, ser comparado com as bandas amplificadas. A corrida foi realizada, durante 2h e 45min, e a fonte de eletroforese (CBS, Scientific Company, Modelo EPS 4000) foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 160 e, a Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres.

4.4.3 Coloração com Nitrato de Prata

Os géis foram retirados das cubas e corados com Nitrato de Prata para a visualização dos fragmentos de DNA.

Reagentes e Soluções

1) *Solução de Nitrato de Prata (10g de Nitrato de Prata, Vetec®; 100mL de H₂O. Dissolver o nitrato de prata em uma parte da água e depois completar com o restante, manter a solução ao abrigo da luz - volume final 100mL);*

2) *Solução Fixadora (160mL de Etanol Absoluto, Merck®, 7mL de Ácido Acético Glacial, Nuclear® e 833 mL de H₂O - volume final 1L);*

3) *Solução Reveladora (22,5g de NaOH, Merck®; 1L de H₂O. Dissolver em um agitador o Hidróxido de Sódio em uma parte da água e depois completar com o restante - volume final 1L. Na hora da coloração adicionar 1mL de Formaldeído para cada 100mL da solução).*

Procedimento

1) *Fixação:* Após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 100mL de Solução Fixadora por 10 min;

2) *Impregnação com Nitrato de Prata:* Adicionou-se 2,0mL de Solução de Nitrato de Prata, e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água quente por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água;

3) *Revelação:* A Solução Reveladora foi adicionada cuidadosamente no recipiente contendo o gel, que foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução foi pré-aquecida em estufa a 65°C, para facilitar a reação de coloração;

4) *Bloqueio da Reação:* Após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 100 mL de Solução Fixadora;

5) *Secagem do Gel:* Após a leitura, todos os géis passaram por um processo de secagem simples para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas de papel celofane foram molhadas; uma placa de vidro, com a área maior que a do gel, foi coberta com uma das folhas; o gel foi colocado sobre a placa com o

celofane sem deixar bolhas; o gel foi então bem molhado e coberto com a outra folha de celofane, também com cuidado de não deixar bolhas; este gel foi deixado secando à temperatura ambiente por dois ou três dias até a secagem completa, sendo então destacado, devidamente identificado e arquivado.

4.4.4 Leitura dos Resultados no Gel

O modo de visualização dos fragmentos de DNA, para a detecção e anotação do polimorfismo de 14pb do gene HLA-G, está representado na figura 5. Nessa figura, é possível observar a presença de uma inserção (1), uma deleção (2) e uma inserção/deleção (3).



Figura 5: Gel de poli-acrilamida corado com nitrato de prata. O gel digitalizado ilustra a presença de uma inserção (1), uma deleção (2) e uma inserção/deleção (3).

4.5 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO 3'UTR

4.5.1 Purificação das Amostras

Reagentes e Soluções

- 1) *Exonuclease I (EXO, 10u/μL, USB®)*;
- 2) *Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP, do inglês Shrimp Alkaline Phosphatase, 1U/μL, USB®)*;
- 3) *Tampão SAP 10X (USB®)*.

Procedimento

As amostras foram purificadas através do uso das enzimas Exonuclease I (EXO) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) para a degradação do excesso de *primers* e para desfosforilar os dNTPs não incorporados. Para isso foram adicionados, em um tubo de 0,2μL (tipo *epENDORF*), 0,5μL de EXO, 0,5μL de SAP, 1μL de Tampão SAP e 5μL de produto de PCR. As amostras foram colocadas em um termociclador

e submetidas a um ciclo de reação de 37°C por 60min e 75°C por 15min.

4.5.2 PCR para a Reação de Sequenciamento

A reação de PCR foi realizada utilizando o reagente *BigDye*® versão 3.1 e o *primer* reverso (HLAG8), anteriormente descrito. Este último foi utilizado, devido ao polimorfismo InDel, com o intuito de evitar o desalinhamento das sequências em amostras heterozigotas para esse polimorfismo.

Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura;
- 2) *Primer Reverse diluído* (HLAGR, 5'-GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT-3'; 3,2 µL de *Primer Reverse* 10pM, IDT®, + 6,8 µL de água);
- 3) *Corante BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits* (Applied Biosystems®);
- 4) *Tampão BigDye® Terminator Sequencing Buffer 5X* (Applied Biosystems®);

Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços: 5,0µL de água; 0,5µL de *Primer R* diluído; 1,0µL de fluoróforo *BigDye*®, 1,5µL *Tampão BigDye*® e 2µL de produto de PCR purificado. Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 96°C por 10s e, a seguir, a 25 ciclos de: 96°C por 10s; 50°C por 5s e 60°C por 4min.

4.5.3 Precipitação das Amostras

Reagentes e Soluções

- 1) *Solução de Acetato de Sódio/EDTA, TA*; (*Acetato de Sódio 1,5M, Sigma-Aldrich*®; *EDTA 259mM, Vetec*®; pH 8,0);
- 2) *Etanol Absoluto, TA* (*Merck*®);
- 3) *Etanol 70%, TA* (*Merck*®).

Procedimento

A precipitação das amostras foi feita da seguinte maneira: em cada poço (nos quais estavam os 10µL da PCR de sequenciamento) foram adicionados 2µL da Solução de Acetato de Sódio /EDTA, a placa foi agitada e, em seguida, foram adicionados 60µL de Etanol Absoluto. A placa foi, novamente, agitada e incubada a TA, no escuro, por 15 min. Em seguida, a placa foi centrifugada (*Centrifuge 5408R, Eppendorf®*) a 2250g (3700 rpm) por 45 min a TA. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido por inversão e, posteriormente, foram adicionados 150µL de etanol 70% em cada poço. A placa foi agitada e submetida a uma nova centrifugação a 2250g (3700 rpm) durante 5 min a TA. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa foi deixada no escuro, *overnight*, para que todo o etanol evaporasse.

4.5.4 Leitura do Sequenciamento das Amostras

Reagentes e Soluções

1) *Formamida Hi-Di (Invitrogen®)*.

Procedimento

Em cada poço da placa, foram adicionados 10µL de Formamida e a placa foi centrifugada (*Centrifuge 5408R, Eppendorf®*) a 500g (800 rpm) por 5 min a TA. Em seguida, as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação, em termociclador (*Mastercycler, Eppendorf®*), a 95°C durante 20 min. Após a desnaturação, a placa foi colocada no sequenciador para ser lida. As amostras foram sequenciadas em um sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems®*), pertencente ao Instituto Geral de Perícias do Estado de Santa Catarina (IGP-SC).

4.5.5 Análises das Sequências

A análise direta das sequências de DNA, da região 3'UTR, foi realizada, através do software *Chromas Lite®*, para a investigação de todos os pontos de variação existentes na região. As variações mais conhecidas para essa região são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single-Nucleotide Polymorphisms*): +3003 T/C (rs1707), +3010 C/G (rs1710), +3027 A/C (rs17179101), +3035 C/T (rs17179108), +3142 G/C (rs1063320), +3187 A/G (rs9380142) e +3196 G/C (rs1610696). A identificação dos polimorfismos foi realizada através da interpretação dos cromatogramas (Figura 6). Os

SNPs de cada amostra foram anotados individualmente em uma planilha de Excel para as análises posteriores.

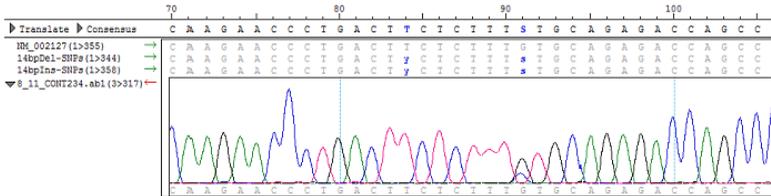


Figura 6: Cromatograma resultante do alinhamento de uma das amostras sequenciadas. Nesta ilustração estão representados os SNPs +3030 (Y) e +3010 (S). Para o primeiro SNP (Y), o indivíduo em questão é homocigoto (GG) enquanto que, para o segundo SNP (S) é heterocigoto (GC).

4.6 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Na qual:

x_i^2 é a frequência esperada dos homocigotos do alelo i ;

$2x_i x_j$ é a frequência esperada do heterocigoto ij ;

$2x_j^2$ é a frequência esperada dos homocigotos para o alelo j .

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada através do programa GENEPOP®, versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Foram realizados três testes baseados na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, teste para detecção da deficiência e para detecção do excesso de heterocigotos.

No teste exato de probabilidade, o valor de p corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado. O segundo e o terceiro são testes mais sensíveis do que o

de probabilidade e utilizam uma hipótese alternativa (H1) de excesso ou de deficiência de heterozigotos, respectivamente.

4.6.2 Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas (x_i) e genotípicas (X_{ii}) de cada *locus*, em casos e controles foram estimadas utilizando-se o programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995) versão 3.4 (disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>), de acordo com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad \text{e} \quad X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Nas quais:

x_i é a frequência do alelo “i”;

X_{ii} é a frequência do genótipo “ii”;

n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente;

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

4.6.3 Análises de Associação

A associação dos genótipos e haplótipos com a susceptibilidade à psoríase foi verificada com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador de *Odds Ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se um Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se $p=0,05$ como o valor limite de significância (WOOLF, 1955). A OR foi calculada por meio da seguinte equação:

$$OR = (ad)/(bc)$$

Na qual:

a é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco e o resultado de interesse;

b é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco, mas não o resultado de interesse;

c é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco, mas apresentam o resultado de interesse;

d é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco nem o resultado de interesse.

A OR é utilizada para representar o aumento das chances de determinado resultado devido à presença de um fator de risco. Para este teste foi utilizado o software HDS *Epimax Table Calculator* (HEALTH DECISION STRATEGIES, 2012).

4.6.4 Desequilíbrio de Ligação

A análise de desequilíbrio de ligação (LD, do inglês *Linkage Disequilibrium*), associação não ao acaso de alelos em diferentes *loci*, foi realizada utilizando-se o programa GENEPOP®, versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A hipótese nula é a de que a distribuição genotípica em um *locus* é independente da distribuição em outro *locus*. A verificação da ocorrência não aleatória de certas combinações alélicas foi realizada pela seguinte fórmula:

$$\Delta_{ab} = p_{ab} - p_a p_b$$

Na qual:

Δ_{ab} é o valor do desequilíbrio de ligação;

p_{ab} é a frequência observada de um haplótipo;

p_a é a frequência observada do alelo *a* de um dado locus;

p_b é a frequência observada do alelo *b* de um outro locus;

$p_a p_b$ é a frequência esperada de um haplótipo *ab*.

O desequilíbrio de ligação pode assumir valores no intervalo de -1,0 a +1,0, sendo que os valores negativos indicam a repulsão entre os alelos em questão, os valores positivos indicam o acoplamento e, o valor zero indica a ausência de desequilíbrio de ligação.

4.6.5 Inferência de Haplótipos

A inferência de haplótipos (*h*), equivalente à heterozigose em dados diplóides, foi estimada considerando a frequência dos haplótipos. As fórmulas da inferência de haplótipos (*h*) e seu desvio padrão (*DP*) são:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$DP = \left\{ \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum p_i^3 - (\sum p_i^2)^2 \right] + \sum p_i^2 - (\sum p_i^2)^2 \right\} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Nas quais:

p_i é a frequência do haplótipo i ;

n é o número de cromossomos da amostra;

k é o número de haplótipos.

Os cálculos foram realizados através do método PHASE (STEPHENS *et al.*, 2001). Para esses cálculos, foram considerados apenas os haplótipos cuja probabilidade foi maior ou igual a 90%. As amostras que não apresentaram esse valor foram excluídas das análises. As frequências haplotípicas foram calculadas da mesma forma que as alélicas e genotípicas.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os 200 indivíduos que compõem a amostra deste estudo, 100 pacientes e 100 indivíduos-controle, residem no estado de Santa Catarina. Nos casos em que dois indivíduos possuíam algum grau de parentesco, um deles foi excluído desse estudo. Os dois grupos, pacientes e indivíduos-controle, foram pareados, para a realização dos testes estatísticos, de acordo com o gênero e a idade, conforme a tabela 2.

Tabela 2: Classificação da amostra, de acordo com gênero e idade, entre pacientes com psoríase (casos) e indivíduos saudáveis (controles).

Dados Epidemiológicos	Casos	Controles
Gênero	(n=100)	(n=100)
Feminino	57	57
Masculino	43	43
Idade	(n=100)	(n=100)
(MÉDIA ± SD)	45,6 ± 12,8	45,3 ± 12,82

n: número amostral; MÉDIA: média entre as amostras; SD: desvio padrão da média.

Os dados epidemiológicos considerados, neste estudo, como fatores de risco para o desenvolvimento e a gravidade da psoríase (presença de sintomas de artrite psoriásica, idade da manifestação dos primeiros sintomas da psoríase e histórico familiar para a doença) estão descritos nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3: Classificação da amostra de pacientes, em valores absolutos, de acordo com a ocorrência de artrite psoriásica.

Ocorrência de Artrite Psoriásica	Sim	Não
Casos (n=100)	16	84

n: número amostral.

Tabela 4: Classificação da amostra de pacientes, em valores absolutos, de acordo com a idade em que ocorreu a manifestação dos primeiros sintomas da psoríase.

Idade de Manifestação da Psoríase	Até 30 anos	Mais de 30 anos
Casos (n=100)	43	57

n: número amostral.

Tabela 5: Classificação da amostra de pacientes, em valores absolutos, de acordo com a presença de psoríase no histórico familiar.

Histórico Familiar de Psoríase	Presente	Ausente
Casos (n=100)	44	56

n: número amostral.

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Através da análise das sequências de DNA, da região 3'UTR do gene *HLA-G*, foram observados oito sítios polimórficos da 3'UTR do gene *HLA-G* (14pb *Del/In*, +3003 *T/C*, +3010 *C/G*, +3027 *C/A*, +3035*C/T*, +3142 *C/G*, +3187 *A/G* e +3196 *C/G*) em pacientes e indivíduos-controle. A partir das quais foram realizadas as seguintes análises estatísticas: equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, frequências alélicas e genotípicas (para casos e controles e para presença ou ausência dos fatores de risco na população de casos), desequilíbrio de ligação, inferência de haplótipos e análises de associação.

5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As distribuições das frequências dos sítios polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* em casos e controles estavam de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, exceto o *locus* +3187*A/G*, que apresentou desvio significativo, tanto na amostra de pacientes ($p=0,0016$) quanto em indivíduos-controle ($p=0,0187$).

5.2.2 Frequências Alélicas, Genotípicas e Análises de Associação

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas de casos e controles estão descritos na tabela 6. Os valores obtidos não foram significativos, o que demonstra não haver relação

direta entre a presença dos polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G* e a ocorrência de psoríase.

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genótípicas para a presença ou ausência, na população de casos, dos fatores de risco para o desenvolvimento e a gravidade da psoríase (ocorrência de artrite psoriásica, idade de manifestação da psoríase e histórico familiar de psoríase) estão representados nas tabelas 7, 8 e 9, respectivamente. Entre os dados de ocorrência de artrite psoriásica, foram observadas as seguintes associações: com o alelo **Del* (OR=2,929; $p=0,019$) e com o genótipo **Del*Del* (OR=4,398; $p=0,015$), para o polimorfismo de 14pb e com o genótipo *+3142*C*C* (OR=6,020; $p=0,015$). Nos dados descritos na tabela 8, relacionados à idade de manifestação da doença, foi encontrada associação entre o alelo *3003*C*T* (OR=0,046; $p=0,013$). A tabela 9 apresenta as relações do histórico familiar de psoríase.

Tabela 6: Frequências alélicas e genotípicas para pacientes e indivíduos-controle, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e *p*.

Polimorfismo	Casos	Frequência	Controles	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
14pb (rs1704)							
Del	109	0,545	112	0,560	0,941	0,622–1,423	0,841
In	91	0,455	88	0,440	1,063	0,703–1,607	0,841
Total de Alelos	200		200				
DelDel	28	0,280	31	0,310	0,866	0,450–1,662	0,756
InDel	53	0,530	50	0,500	1,128	0,623–2,041	0,777
InIn	19	0,190	19	0,190	0,000	0,000–0,000	1,000
Total de Indivíduos	100		100				
+3003 (rs1707)							
C	14	0,108	11	0,096	1,381	0,583–3,630	0,614
T	116	0,892	103	0,904	0,724	0,276–1,875	0,614
Total de Alelos	130		114				
CC	2	0,031	2	0,035	0,873	0,084–9,050	1,000
CT	10	0,154	7	0,123	1,299	0,414–4,140	0,817
TT	53	0,815	48	0,842	0,828	0,290–2,345	0,881
Total de Indivíduos	65		57				

Polimorfismo	Casos	Frequência	Controles	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3010 (rs1710)							
G	72	0,554	55	0,482	1,332	0,779–2,277	0,325
C	58	0,446	59	0,518	0,751	0,439–1,283	0,325
Total de Alelos	130		114				
GG	21	0,323	13	0,228	1,615	0,670–3,924	0,335
GC	30	0,462	29	0,509	0,828	0,381–1,795	0,734
CC	14	0,215	15	0,263	0,952	0,386–2,343	1,000
Total de Indivíduos	65		57				
+3027 (rs17179101)							
A	6	0,046	4	0,035	2,463	0,587– 10,854	0,288
C	124	0,954	110	0,956	0,406	0,092–1,703	0,288
Total de Alelos	130		114				
AA	0	0,000	0	0,000	0,878	0,001–912,8	1,000
AC	6	0,092	4	0,070	1,347	0,313–6,069	0,910
CC	59	0,908	53	0,930	0,742	0,165–3,194	0,910
Total de Indivíduos	65		57				

Polimorfismo	Casos	Frequência	Controles	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3035 (rs17179108)							
C	109	0,838	98	0,860	0,847	0,395–1,810	0,778
T	21	0,162	16	0,140	1,180	0,552–2,531	0,778
Total de Alelos	130		114				
CC	44	0,677	43	0,754	0,682	0,285–1,624	0,457
CT	21	0,323	12	0,211	1,790	0,731–4,422	0,234
TT	0	0,000	2	0,035	0,169	0,000–3,397	0,484
Total de Indivíduos	65		57				
+3142 (rs1063320)							
G	62	0,477	61	0,535	0,792	0,464–1,353	0,436
C	68	0,523	53	0,465	1,262	0,739–2,157	0,436
Total de Alelos	130		114				
GG	14	0,215	16	0,281	0,703	0,284–1,737	0,532
GC	34	0,523	29	0,509	1,059	0,489–2,296	1,000
CC	17	0,262	12	0,210	1,328	0,529–3,358	0,654
Total de Indivíduos	65		57				

Polimorfismo	Casos	Frequência	Controles	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3187 (rs9380142)							
G	35	0,357	30	0,312	1,222	0,644–2,321	0,612
A	63	0,643	66	0,688	0,818	0,431–1,552	0,612
Total de Alelos	98		96				
GG	1	0,020	1	0,021	0,979	0,026– 36,924	1,000
GA	33	0,673	28	0,583	1,473	0,594–3,669	0,478
AA	15	0,306	19	0,396	0,673	0,267–1,690	0,476
Total de Indivíduos	49		48				
+3196 (rs1610696)							
G	34	0,386	31	0,337	1,239	0,644–2,385	0,592
C	54	0,614	61	0,663	0,807	0,419–1,552	0,592
Total de Alelos	88		92				
GG	3	0,068	3	0,065	1,049	0,157–7,009	1,000
GC	28	0,636	25	0,543	1,470	0,581–3,737	0,496
CC	13	0,296	18	0,392	0,652	0,247–1,713	0,462
Total de Indivíduos	44		46				

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

Os valores significativos estão anotados com *.

Os cálculos constam no Apêndice E.

Tabela 7: Frequências alélicas e genotípicas para a população de pacientes, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a ocorrência de artrite psoriásica, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e *p*.

Polimorfismo	Com Artrite Psoriásica	Frequência	Sem Artrite Psoriásica	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
14pb (rs1704)							
Del	24	0,750	85	0,506	2,929	1,169–7,557	0,019*
In	8	0,250	83	0,494	0,341	0,132–0,856	0,019*
Total de Alelos	32		168				
DelDel	9	0,562	19	0,226	4,398	1,278–15,447	0,015*
InDel	6	0,375	47	0,560	0,472	0,137–1,587	0,280
InIn	1	0,063	18	0,214	0,244	0,011–1,987	0,285
Total de Indivíduos	16		84				
+3003 (rs1707)							
C	4	0,167	10	0,094	1,920	0,453–7,647	0,504
T	20	0,833	96	0,906	0,521	0,131–2,208	0,504
Total de Alelos	24		106				
CC	4	0,333	45	0,849	0,824	0,001–18,342	1,000
CT	0	0,000	2	0,038	3,917	0,720–21,406	0,143
TT	8	0,667	6	0,113	0,356	0,070–1,821	0,290
Total de Indivíduos	12		53				

Polimorfismo	Com Artrite Psoriásica	Frequência	Sem Artrite Psoriásica	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3010 (rs1710)							
G	17	0,708	51	0,519	0,444	0,152–1,259	0,145
C	7	0,292	55	0,481	2,252	0,794–6,576	0,145
Total de Alelos	24		106				
GG	7	0,583	14	0,264	3,900	0,905–17,423	0,072
GC	3	0,250	27	0,510	0,321	0,061–1,515	0,191
CC	2	0,167	12	0,236	0,683	0,089–4,109	0,948
Total de Indivíduos	12		53				
+3027 (rs17179101)							
A	1	0,042	5	0,047	0,878	0,036–8,449	1
C	23	0,958	101	0,953	1,139	0,118–27,508	1
Total de Alelos	24		106				
AA	0	0,000	0	0,000	4,280	0,004–4603,04	1,000
AC	1	0,103	5	0,094	0,873	0,036–9,351	1,000
CC	11	0,917	48	0,906	1,146	0,107–28,108	1,000
Total de Indivíduos	12		53				

Polimorfismo	Com Artrite Psoriásica	Frequência	Sem Artrite Psoriásica	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3035 (rs17179108)							
C	21	0,875	88	0,830	1,432	0,350–6,756	0,817
T	3	0,125	18	0,170	0,698	0,148–2,857	0,817
Total de Alelos	24		106				
CC	9	0,750	35	0,660	1,543	0,321–8,270	0,797
CT	3	0,250	18	0,340	0,648	0,121–3,120	0,797
TT	0	0,000	0	0,000	4,280	0,004–4603,04	1,000
Total de Indivíduos	12		53				
+3142 (rs1063320)							
G	7	0,292	55	0,519	0,382	0,131–1,082	0,074
C	17	0,708	51	0,481	2,619	0,924–7,654	0,074
Total de Alelos	24		106				
GG	2	0,167	12	0,226	0,567	0,073–3,440	0,764
GC	3	0,250	31	0,585	0,237	0,044–1,120	0,075
CC	7	0,583	10	0,189	6,020	1,332–28,554	0,015*
Total de Indivíduos	12		53				

Polimorfismo	Com Artrite Psoriásica	Frequência	Sem Artrite Psoriásica	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3187 (rs9380142)							
G	9	0,375	26	0,351	0,903	0,317–2,609	1,000
A	15	0,625	48	0,649	1,108	0,383–3,171	1,000
Total de Alelos	24		74				
GG	1	0,083	0	0,000	9,652	0,294–6977,60	0,423
GA	7	0,584	26	0,703	0,592	0,127–2,773	0,680
AA	4	0,333	11	0,297	1,182	0,236–5,735	1,000
Total de Indivíduos	12		37				
+3196 (rs1610696)							
G	7	0,292	27	0,422	0,564	0,181–1,712	0,881
C	17	0,708	37	0,578	1,251	0,389–4,097	0,881
Total de Alelos	24		64				
GG	0	0,000	3	0,094	0,880	0,001–6,651	0,337
GC	7	0,583	21	0,656	0,733	0,154–3,501	0,924
CC	5	0,417	8	0,250	2,143	0,430–10,823	0,470
Total de Indivíduos	12		32				

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

Os valores significativos estão anotados com *.

Os cálculos constam no Apêndice F.

Tabela 8: Frequências alélicas e genotípicas para a população de pacientes, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a idade de manifestação dos primeiros sintomas da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

Polimorfismo	Até os 30 anos	Frequência	Após os 30 anos	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
<i>14pb (rs1704)</i>							
Del	43	0,500	65	0,579	0,754	0,413–1,375	0,400
In	43	0,500	49	0,421	1,327	0,727–2,421	0,400
Total de Alelos	86		114				
DelDel	12	0,279	16	0,281	0,992	0,375–2,616	1,000
InDel	19	0,442	33	0,579	0,576	0,248–1,388	0,248
InIn	12	0,279	8	0,140	2,371	0,787–7,216	0,143
Total de Indivíduos	43		57				
<i>+3003 (rs1707)</i>							
C	4	0,071	10	0,135	0,492	0,122–1,846	0,382
T	52	0,929	64	0,865	2,031	0,542–8,219	0,382
Total de Alelos	56		74				
CC	2	0,071	0	0,000	7,075	0,338–4488,11	0,403
CT	0	0,000	10	0,270	0,046	0–0,662	0,013*
TT	26	0,929	27	0,730	4,815	0,853–35,407	0,084
Total de Indivíduos	28		37				

Polimorfismo	Até os 30 anos	Frequência	Após os 30 anos	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3010 (rs1710)							
G	27	0,482	45	0,608	0,600	0,280–1,284	0,211
C	29	0,518	29	0,392	1,667	0,779–3,576	0,211
Total de Alelos	56		74				
GG	8	0,286	13	0,351	0,738	0,223–2,414	0,770
GC	11	0,393	19	0,514	0,613	0,2–1,858	0,474
CC	9	0,321	5	0,135	3,032	0,769–12,45	0,132
Total de Indivíduos	28		37				
+3027 (rs17179101)							
A	2	0,036	4	0,054	0,648	0,079–4,336	0,943
C	54	0,964	70	0,946	1,543	0,231–12,664	0,943
Total de Alelos	56		74				
AA	0	0,000	0	0,000	1,316	0,001–1388,27	1,000
AC	2	0,071	4	0,108	0,635	0,074–4,536	0,942
CC	26	0,929	33	0,892	1,576	0,22–13,553	0,942
Total de Indivíduos	28		37				

Polimorfismo	Até os 30 anos	Frequência	Após os 30 anos	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3035 (rs17179108)							
C	50	0,893	59	0,797	2,119	0,700–6,668	0,221
T	6	0,107	15	0,203	0,472	0,150–1,429	0,221
Total de Alelos	56		74				
CC	22	0,786	22	0,595	2,500	0,725–8,902	0,173
CT	6	0,214	15	0,405	0,400	0,112–1,378	0,173
TT	0	0,000	0	0,000	1,316	0,001–1388,27	1,000
Total de Indivíduos	28		37				
+3142 (rs1063320)							
G	30	0,536	32	0,432	1,514	0,711–3,235	0,323
C	26	0,464	42	0,568	0,660	0,309–1,407	0,323
Total de Alelos	56		74				
GG	9	0,321	5	0,135	3,032	0,769–12,45	0,132
GC	12	0,429	22	0,595	0,511	0,167–1,50	0,282
CC	7	0,250	10	0,270	0,900	0,254–3,157	1,000
Total de Indivíduos	28		37				

Polimorfismo	Até os 30 anos	Frequência	Após os 30 anos	Frequência	OR	IC	P
+3187 (rs9380142)							
G	15	0,357	20	0,357	1,000	0,0–0,0	1,000
A	27	0,643	36	0,643	1,000	0,0–0,0	1,000
Total de Alelos	42		56				
GG	1	0,048	0	0,000	4,171	0,132–2967,9	0,842
GA	13	0,619	20	0,714	0,650	0,165–2,544	0,692
AA	7	0,333	8	0,286	1,250	0,311–5,029	0,965
Total de Indivíduos	21		28				
+3196 (rs1610696)							
G	16	0,400	18	0,375	1,111	0,430–2,874	0,984
C	24	0,600	30	0,625	0,900	0,348–2,327	0,984
Total de Alelos	40		48				
GG	2	0,100	1	0,042	2,556	0,16–77,025	0,870
GC	12	0,600	16	0,667	0,750	0,183–3,058	0,887
CC	6	0,300	7	0,291	1,041	0,235–4,597	1,000
Total de Indivíduos	20		24				

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p: probabilidade.

Os valores significativos estão anotados com *.

Os cálculos constam no Apêndice G.

Tabela 9: Frequências alélicas e genotípicas para a população de pacientes, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o histórico familiar de psoríase, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e *p*.

Polimorfismo	Com Histórico Familiar	Frequência	Sem Histórico Familiar	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
14pb (rs1704)							
Del	50	0,568	59	0,527	1,182	0,648–2,156	0,659
In	38	0,432	53	0,473	0,846	0,464–1,542	0,659
Total de Alelos	88						
DelDel	15	0,341	13	0,232	1,711	0,651–4,552	0,328
InDel	20	0,455	10	0,179	0,581	0,242–1,389	0,255
InIn	9	0,204	33	0,589	1,183	0,389–3,589	0,943
Total de Indivíduos	44		56				
+3003 (rs1707)							
C	4	0,071	10	0,135	0,492	0,122–1,846	0,382
T	52	0,929	64	0,865	2,031	0,542–8,219	0,382
Total de Alelos	56		74				
CC	0	0,000	2	0,054	0,249	0–5,221	0,722
CT	4	0,143	6	0,162	0,861	0,178–4,015	1,000
TT	24	0,857	29	0,784	1,655	0,383–7,567	0,665
Total de Indivíduos	28		37				

Polimorfismo	Com Histórico Familiar	Frequência	Sem Histórico Familiar	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3010 (rs1710)							
G	31	0,554	41	0,554	0,998	0,468–2,130	1,000
C	25	0,446	33	0,446	1,002	0,469–2,138	1,000
Total de Alelos	56		74				
GG	10	0,357	11	0,297	1,313	0,407–4,248	0,808
GC	11	0,393	19	0,514	0,613	0,2–1,858	0,474
CC	7	0,250	7	0,189	1,429	0,376–5,457	0,775
Total de Indivíduos	28		37				
+3027 (rs17179101)							
A	3	0,054	3	0,041	1,340	0,205–8,748	1,000
C	53	0,946	71	0,959	0,746	0,114–4,871	1,000
Total de Alelos	56		74				
AA	0	0,000	0	0,000	1,316	0,001–1388,2	1,000
AC	3	0,107	3	0,081	1,360	0,196–9,441	1,000
CC	25	0,893	34	0,919	0,735	0,106–5,098	1,000
Total de Indivíduos	28		37				

Polimorfismo	Com Histórico Familiar	Frequência	Sem Histórico Familiar	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3035 (rs17179108)							
C	45	0,804	64	0,865	0,639	0,227–1,791	0,484
T	11	0,196	10	0,135	1,564	0,558–4,403	0,484
Total de Alelos	56		74				
CC	17	0,607	27	0,730	0,572	0,176–1,850	0,436
CT	11	0,393	10	0,270	1,747	0,541–5,697	0,436
TT	0	0,000	0	0,000	1,316	0,001–1388,2	1,000
Total de Indivíduos	28		37				
+3142 (rs1063320)							
G	26	0,464	36	0,486	0,915	0,430–1,945	0,942
C	30	0,536	38	0,514	1,093	0,514–2,326	0,942
Total de Alelos	56		74				
GG	7	0,250	7	0,189	1,429	0,376–5,457	0,775
GC	12	0,429	22	0,595	0,511	0,167–1,550	0,282
CC	9	0,321	8	0,216	1,717	0,493–6,040	0,502
Total de Indivíduos	28		37				

Polimorfismo	Com Histórico Familiar	Frequência	Sem Histórico Familiar	Frequência	OR	IC	<i>p</i>
+3187 (rs9380142)							
G	15	0,341	20	0,630	0,879	0,352–2,193	0,928
A	29	0,639	34	0,370	1,137	0,456–2,845	0,928
Total de Alelos	44		54				
GG	1	0,045	0	0,000	0,613	0,151–2,447	0,633
GA	13	0,591	20	0,741	0,506	0,126–1,984	0,420
AA	8	0,364	7	0,259	1,633	0,409–6,609	0,633
Total de Indivíduos	22		27				
+3196 (rs1610696)							
*G	12	0,316	22	0,440	0,587	0,221–1,551	0,335
*C	26	0,684	28	0,560	1,702	0,645–4,534	0,335
Total de Alelos	36		50				
GG	1	0,053	2	0,080	0,639	0,002–10,24	1,000
GC	10	0,526	18	0,720	0,432	0,101–1,794	0,315
CC	8	0,421	5	0,200	2,909	0,640–13,80	0,209
Total de Indivíduos	19		25				

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

Os valores significativos estão anotados com *.

Os cálculos constam no Apêndice H.

5.3 Desequilíbrio de Ligação

A análise das probabilidades de segregação entre sítios polimórficos foi realizada pelo teste de desequilíbrio de ligação (LD). Os oito sítios polimórficos, considerados par a par, permitiram 28 comparações. Dentre essas, foi observado desequilíbrio de ligação ($p \leq 0,05$) entre 11 pares, os outros 17 pares se comportaram como *loci* não ligados ($p > 0,005$). As probabilidades estão descritas na tabela 10.

Tabela 10: Probabilidades (p) do teste exato de desequilíbrio de ligação para os oito sítios polimórficos detectados na 3'UTR do *HLA-G* em pacientes e indivíduos-controle ($p \leq 0,05$).

Polimorfismos	14pb D/I	+3003 T/C	+3010 C/G	+3027 A/C	+3035 C/T	+3142 G/C	+3187 A/G	+3196 G/C
14pb D/I	-							
+3003 T/C	0,398	-						
+3010 C/G	<0,001*	0,094	-					
+3027 A/C	0,677	0,154	0,518	-				
+3035 C/T	0,002*	0,714	0,221	<0,001*	-			
+3142 G/C	<0,001*	0,035*	<0,001*	0,526	0,227	-		
+3187 A/G	0,106	0,234	<0,001*	0,727	0,975	<0,001*	-	
+3196 G/C	<0,001*	0,850	0,039*	0,299	0,165	0,009*	0,206	-

Desequilíbrio de ligação (GENEPOP).

Os valores significativos estão anotados com *.

5.4 Inferência de Haplótipos

Devido a presença de desequilíbrio de ligação entre os sítios polimórficos analisados, a inferência de haplótipos foi realizada através de métodos probabilísticos levando-se em consideração seis dos oito sítios polimórficos da 3'UTR (14pb *Del/Ins*, +3003 *T/C*, +3010 *C/G*, +3027 *C/A*, +3035 *C/T* e +3142 *C/G*). Os outros dois sítios polimórficos +3187 *A/G* e +3196 *C/G* foram excluídos desta análise, pois apresentaram, em algumas amostras, problemas na técnica de sequenciamento. Neste teste, foram avaliados esses polimorfismos para 51 casos e 46 controles conjuntamente. O método PHASE foi utilizado para a dedução dos haplótipos e estes foram nomeados de acordo com Castelli *et al.*, 2010. Os haplótipos observados e as suas frequências, em casos e controles, estão descritos na Tabela 11. Não foram observadas associações entre os haplótipos encontrados em casos e controles.

Tabela 11: Haplótipos inferidos para 3'UTR de *HLA-G*, suas frequências para as populações de casos e controles, cálculos de associação (OR) entre haplótipos e o desenvolvimento da psoríase, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

UTR	Haplótipos	Casos (n=52)	Frequência	Controles (n=48)	Frequências	OR	IC	<i>P</i>
UTR1e6	DelTGCCC	40	0,385	38	0,396	0,954	0,519–1,753	0,986
UTR2e15	InsTCCCG	26	0,250	27	0,281	0,852	0,433–1,674	0,734
UTR3e10	DelTCCCG	11	0,106	12	0,125	0,828	0,320–2,138	0,839
UTR4	DelCGCCC	9	0,086	8	0,083	1,042	0,349–3,127	1,000
UTR5e16	InsTCCTG	5	0,048	5	0,052	0,919	0,2223,811	1,000
UTR7	InsTCA TG	2	0,019	2	0,021	0,922	0,091–9,344	1,000
UTR8	InsTGCCG	5	0,048	0	0,000	10,613	0,721–5987,754	0,120
UTR11	DelCCCCG	1	0,010	0	0,000	2,783	0,095–1917,783	1,000
UTR14	DelTGCCG	0	0,000	1	0,010	0,305	0,000–8,953	0,955
UTR17	DelTGCTC	3	0,029	0	0,000	6,621	0,394–3912,472	0,355
UTR18	InsCCCCG	1	0,010	1	0,010	0,922	0,025–34,068	1,000
UTR19	InsCCCTC	0	0,000	1	0,010	0,305	0,000–8,953	0,955
UTR20	InsTGCCC	1	0,010	0	0,000	2,783	0,095–1917,783	1,000
UTR21	InsTCCTC	0	0,000	1	0,010	0,305	0,000–8,953	0,955

Inferência de haplótipos e associações (PHASE e HDS EpiMax); n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. Os valores significativos estão anotados com *.

6 DISCUSSÃO

As células residentes na pele, em condições normais, não expressam HLA-G (UROSEVIC, 2007), porém estudos realizados em biópsias de pele de pacientes com psoríase descreveram a presença da molécula HLA-G nas lesões apresentadas por esses indivíduos (ARACTINGI *et al.*, 2001; CARDILI *et al.*, 2010). Nessas lesões, os macrófagos que revestem as junções dermo-epidérmicas são as células que apresentam maior expressão de HLA-G. É possível que a expressão de HLA-G por essas células seja uma tentativa de neutralização da ação de células T autorreativas (UROSEVIC, 2007). No entanto, Borghi *et al.*, em 2008, observaram níveis baixos de HLA-G no plasma de pacientes com psoríase, o que sugere uma condição propícia para o desenvolvimento do processo inflamatório. É importante ressaltar que, apesar de os estudos terem demonstrado que os indivíduos com psoríase expressam HLA-G, a presença da molécula não foi capaz de impedir o desenvolvimento da doença.

Na tentativa de relacionar o gene *HLA-G* com a susceptibilidade à psoríase, este estudo realizou a análise dos polimorfismos, até o momento identificados, da 3'UTR. Uma vez que essa região possui elementos de regulação da expressão da molécula (como por exemplo, influência na tradução e susceptibilidade à degradação do mRNA) e os diferentes genótipos obtidos podem ser associados a uma maior ou menor expressão de *HLA-G* (ALVES *et al.*, 2012).

Após a análise dos alelos e genótipos observados em casos e controles, não foram verificadas associações entre os polimorfismos estudados e a susceptibilidade dos indivíduos para desenvolver a psoríase. Por outro lado, quando foram realizadas as análises das relações desses genótipos com alguns dos dados epidemiológicos e clínicos, foram observadas algumas associações.

Um dos dados clínicos considerado na análise de comparação foi a ocorrência ou não de artrite psoriásica na população de casos. A artrite psoriásica é uma inflamação crônica que atinge as articulações e que ocorre em combinação com a psoríase. O surgimento dos sintomas articulares pode acontecer antes, depois ou concomitantemente ao aparecimento das lesões na pele. Apesar de ser considerada, por muitos autores, como um sintoma da psoríase ainda há dúvidas se a artrite psoriásica e a psoríase são, realmente, variantes de uma mesma doença ou se são patologias distintas (CHANDRAN, 2012; RUIZ *et al.*, 2012).

Para esse dado, os pacientes que apresentam sintomas de artrite psoriásica mostraram uma frequência mais alta do alelo deleção (*Del; OR=2,929; $p=0,019$). Da mesma forma, o genótipo *Del*Del apresentou associação com a ocorrência de artrite psoriásica ($p=0,015$; OR=4,398). Quando foi realizada a análise de associação entre os indivíduos que apresentam genótipos com o alelo *Del (*Del*Del e *In*Del) e os indivíduos homocigotos para o alelo inserção (*In), também foi observado um alto valor de OR (OR=4,091), porém, neste caso, o valor de p não foi significativo ($p=0,285$). Esses dados indicam que a associação positiva com a artrite psoriásica é maior quando o alelo *Del encontra-se em homocigose.

O papel desse polimorfismo na magnitude da produção da molécula HLA-G não está, ainda, bem elucidado. A presença do alelo que apresenta a inserção dos 14pb tem sido relacionada à produção de uma menor subpopulação de transcrito primário. No entanto, apesar de gerar uma subpopulação menor, o transcrito produzido é mais estável do que aquele produzido pelo alelo *Del, que não acarreta a deleção dos 92pb (ALVES *et al.*, 2012). Essa instabilidade do transcrito está, possivelmente, relacionada à baixa expressão da molécula em indivíduos que apresentam a variante *Del.

Dessa forma, os sintomas inflamatórios da artrite psoriásica demonstram que os níveis de HLA-G, expressos por esses indivíduos, não são capazes de inibir a ação pró-inflamatória das células do sistema imune. Dados da literatura mostram que o alelo *Del e o genótipo *Del*Del foram também associados à ocorrência de outra patologia inflamatória crônica: a artrite idiopática juvenil (VEIT *et al.*, 2008). A sintomatologia dessa doença, assim como a artrite psoriásica, é caracterizada pela presença de uma forte resposta inflamatória direcionada às articulações e à destruição tecidual (VEIT *et al.*, 2008)..

Além desses polimorfismos, os pacientes com sintomas de artrite psoriásica apresentaram uma frequência mais alta do genótipo +3142*C*C (OR=6,020; $p=0,015$). Esse dado, no entanto, é contraditório. Pois, diante das associações observadas nos outros polimorfismos, esperava-se encontrar associação com um genótipo que também indicasse uma baixa expressão da molécula de HLA-G. Contudo, dados da literatura demonstram associação do alelo +3142*G e do genótipo +3142*G*G a baixos níveis de expressão de HLA-G, tanto em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico quanto em indivíduos asmáticos. Nesses casos, a associação do alelo *G está

relacionada à ação de fatores pós-transcricionais visto que esse polimorfismo é alvo de miRNAs. Tan *et al.*, relataram, em 2007, que a associação desse alelo com três microRNAs (miR-148a, miR-q48-b e miR-153) promove uma redução da expressão de HLA-G *in vivo*.

No intuito de resolver essa contradição, outros estudos de associação entre pacientes de psoríase, com e sem artrite psoriásica, devem ser realizados. Para isso, devem ser levados em consideração este e outros dados epidemiológicos e clínicos desses indivíduos. Além disso, também seria interessante, realizar estudos que relacionem os polimorfismos à expressão do *HLA-G*, tanto em nível transcricional quanto na tradução da molécula.

Apesar de, assim como a psoríase, outras patologias inflamatórias apresentarem variações quanto à idade de manifestação dos primeiros sintomas, não existem estudos na literatura que relacionem esse dado epidemiológico com os polimorfismos do gene *HLA-G*.

Dessa forma, neste estudo, verificou-se também possíveis associações entre os polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* e a idade em que os pacientes manifestaram os primeiros sintomas da psoríase. Após a realização das análises foi observada uma associação do genótipo +3003*C*T (OR=0,046; $p=0,013$) para não desenvolver a doença antes dos 30 anos de idade. Os genótipos +3003*T*T e +3003*C*C apresentaram valores de OR que indicam risco para o desenvolvimento da doença antes dos 30 anos de idade, porém os valores de p não foram significativos.

Um estudo *in silico*, realizado em 2009, demonstrou que o polimorfismo +3003 está localizado em uma região de ligação a microRNAs. Alguns desses microRNAs, que podem interagir com essa região, possuem especificidade para ligar-se com o alelo *T ou com o alelo *C. Além disso, existem ainda, alguns microRNAs que se ligam a haplótipos específicos +3003*T ou *C/+3010*G ou *C (CASTELLI *et al.*, 2009). Sendo assim, é possível perceber que, além dos polimorfismos do gene *HLA-G*, é preciso, também, conhecer melhor as variações de expressão de microRNAs nas células e tecidos de interesse. Considerando que a regulação da expressão da molécula *HLA-G* pode ser resultado do somatório do tipo de microRNA produzido com o polimorfismo presente no gene, além, é claro, de outros fatores regulatórios.

Os diferentes haplótipos encontrados nas populações de casos e controles, através da análise de seis polimorfismos da 3'UTR (+3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C) foram analisados no intuito de identificar possíveis haplótipos de susceptibilidade ou proteção à psoríase. Dois dos polimorfismos da região (+3187 e +3196) foram excluídos das análises de haplótipos devido a problemas na metodologia de sequenciamento das amostras. A exclusão desses dois últimos SNPs foi realizada para que o número amostral, usado para a inferência dos haplótipos, não tivesse uma redução considerável. Dessa forma, os haplótipos *UTR 1* e *UTR 6*, *UTR 2* e *UTR 15*, *UTR 3* e *UTR 10* e *UTR 5* e *UTR 16* foram considerados pertencentes ao mesmo grupo, uma vez que o SNP que os diferencia é, justamente, um dos dois SNPs que foram excluídos. Após a execução do método, foram obtidos 14 diferentes haplótipos na população estudada (composta de 100 indivíduos, 52 casos e 48 controles). Desses 14 haplótipos, cinco ainda não estão descritos na literatura e foram denominados *UTR17*, *UTR18*, *UTR19*, *UTR20* e *UTR21*. Novas análises precisam ser realizadas para a confirmação desses cinco novos haplótipos observados.

Os dados de desequilíbrio de ligação mostram um grande número de pares de *loci* que se encontram segregando de forma independente o que não está em total acordo com os dados da literatura, que mostram forte LD para essa região. As explicações para isso podem ser uma questão de tamanho amostral ou uma característica da população estudada. Novos estudos na população do estado de Santa Catarina deverão ser feitos para esclarecer melhor essa questão.

Os polimorfismos da 3'UTR podem influenciar a expressão da molécula HLA-G através de diferentes mecanismos: alterando a capacidade transcricional do gene, modulando a estabilidade do transcrito primário do *HLA-G*, ou sofrendo a ação de miRNAs, que diminuem a capacidade de tradução da molécula de mRNA (ALVES *et al.*, 2012; CASTELLI *et al.*, 2009).

Os dados obtidos neste estudo demonstram que esses polimorfismos estão relacionados à susceptibilidade à psoríase e aos fatores aqui considerados, de risco para o desenvolvimento e a gravidade dessa patologia. Podendo destacar dentre esses últimos, as associações encontradas, entre aqueles pacientes que apresentam sintomas de artrite psoriásica e aqueles que não apresentam que, como em outros estudos relacionados às doenças inflamatórias, apresentam um polimorfismo relacionado à baixa expressão de *HLA-G*.

Característica essa, que pode estar diretamente relacionada à manutenção do processo inflamatório nesses indivíduos.

Por fim, neste estudo, foram encontradas as seguintes associações entre a patologia, seus fatores de risco e os polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G*: (1) para pacientes que apresentam ou não sintomas de artrite psoriásica, o alelo **Del* e o genótipo **Del*Del* do polimorfismo de 14pb assim como o genótipo *+3142*C*C*; (2) e para aqueles que apresentaram sintomas antes dos 30 anos de idade o genótipo *+3003*C*T*; e (3) para a susceptibilidade de desenvolvimento da psoríase.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos entre as possíveis relações da psoríase e os polimorfismos do gene *HLA-G*, pode-se considerar que:

- Para os pacientes com sintomas de artrite psoriásica foram observadas associações para o polimorfismo *14pb InDel* com o alelo **Del* e o genótipo **Del*Del*, indicando que este alelo, principalmente em homozigose, apresenta associação positiva com a artrite psoriásica.

- Os pacientes com sintomas de artrite psoriásica apresentaram também frequência mais alta do genótipo *+3142*CC*, este resultado é contraditório às demais associações encontradas, uma vez que este genótipo é associado com alta expressão da molécula *HLA-G*.

- Esse é o primeiro estudo que associa a idade de surgimento dos primeiros sintomas com o polimorfismo do gene *HLA-G*. O genótipo associado com o surgimento destes sintomas após os 30 anos de idade foi *+3003*C*T*.

Considerando os dados obtidos podemos dizer que os sintomas inflamatórios da artrite psoriásica está associado com alelo e genótipo relacionados à baixa expressão da molécula *HLA-G*. Apesar de dados da literatura demonstrarem que a molécula *HLA-G* está presente em lesões psoriásicas, os níveis de *HLA-G* expressos por esses indivíduos parecem não ser capazes de inibir a ação pró-inflamatória das células do sistema imune.

Desta forma, outros estudos de associação de *HLA-G* com psoríase devem ser realizados e, para isso, devem ser levados em consideração esses e outros dados epidemiológicos e clínicos desses indivíduos. Além disso, também seria interessante, realizar estudos que relacionem os polimorfismos à expressão do *HLA-G*, tanto em nível transcricional quanto na tradução da molécula.

Isto porque, a regulação da produção da molécula *HLA-G* pode ser resultado do somatório do tipo de microRNA produzido, com o polimorfismo presente na 3'UTR do gene, além de outros fatores regulatórios. Assim, também é importante conhecer melhor as variações de expressão de microRNAs nas células e tecidos de interesse.

REFERÊNCIAS

ALVES, D.; CRISPIM, J.; CASTELLI, E. *et al.* Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. **Human immunology**, v. 73, n. 1, p. 52-9, jan 2012.

ARACTINGI, S.; BRIAND, N.; DANFF, C. LE; *et al.* HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? **The American journal of pathology**, v. 159, n. 1, p. 71-7, jul 2001.

BOWCOCK, A.; KRUEGER, J. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, set 2005.

CAMPBELL, E.; ANTONIOU, A.; POWIS, S. The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. **Immunology**, v. 136, n. 4, p. 380-4, ago 2012.

CARDILI, R.; ALVES, T.; FREITAS, J. *et al.* Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis. **The British journal of dermatology**, v. 163, n. 4, p. 769-75, out 2010.

CARDILI, R. N.; DONADI, E. A. Expression of HLA-G primarily targets affected skin of psoriasis patients *. 2010.

CAROSELLA, E.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LEMAULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-70, 15 maio 2008.

CAROSELLA, E.; GREGORI, S.; ROUAS-FREISS, N. *et al.* The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 3, p. 353-68, fev 2011.

CAROSELLA, E.; MOREAU, P.; LEMAULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends in immunology**, v. 29, n. 3, p. 125-32, mar 2008.

CASTELLI, E.; MENDES-JUNIOR, C.; DEGHAIDE, N. *et al.* The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, v. 11, n. 2, p. 134-41, mar 2010.

CASTELLI, E.; MENDES-JUNIOR, C.; VEIGA-CASTELLI, L. *et al.* A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene:

- implication for gene regulation and evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 11, p. 3069-86, nov 2011.
- CASTELLI, E.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A. *et al.* In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Human immunology**, v. 70, n. 12, p. 1020-5, dez 2009.
- CHANDRAN, V. Soluble biomarkers may differentiate psoriasis from psoriatic arthritis. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 89, p. 65-6, jul 2012.
- CHAPLIN, D. Overview of the immune response. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S3-23, fev 2010.
- CHESLEY, P.; DUNN, L. The Inheritance of Taillessness (Anury) in the House Mouse. **Genetics**, v. 21, n. 5, p. 525-536, 1936.
- CONSIGLIO, C.; VEIT, T.; MONTICIELO, O. *et al.* Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Tissue antigens**, v. 77, n. 6, p. 540-5, jun 2011.
- DER VEN, K. VAN; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G Polymorphisms and Molecule Function—Questions and More Questions—A Review. **Placenta**, v. 21, p. S86-S92, mar 2000.
- DERMATOLOGIA, S. B. DE. **Consenso Brasileiro de Psoríase**. [S.l.: s.n.], 2009. p. 115
- DOHERTY, P.; ZINKERNAGEL, R. A biological role for the major histocompatibility antigens. **Lancet**, v. 28, n. 1, p. 1406-1409, 1975.
- DONADI, E.; CASTELLI, E.; ARNAIZ-VILLENA, A. *et al.* Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 3, p. 369-95, fev 2011.
- DUFFIN, K.; WOODCOCK, J.; KRUEGER, G. Genetic variations associated with psoriasis and psoriatic arthritis found by genome-wide association. **Dermatologic therapy**, v. 23, n. 2, p. 101-13, 2010.
- DUNPHY, S.; GARDINER, C. NK cells and psoriasis. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 1-10, jan 2011.
- FAVIER, B.; LEMAULT, J.; ROUAS-FREISS, N. *et al.* Research on HLA-G: an update. **Tissue antigens**, v. 69, n. 3, p. 207-11, mar 2007.
- FELETAR, M.; FOLEY, P.; BROWN, M. Developments in psoriasis and psoriatic arthritis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 1, p. e47-e54, mar 2008.

- GRIFFITHS, C.; BARKER, J. Psoriasis pathogenesis and clinical features of psoriasis. **Lancet**, v. 21(9583), n. 370, p. 263-271, 2007.
- GUDJONSSON, J.; ELDER, J. Psoriasis: epidemiology. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 6, p. 535-546, 2007.
- HUEBER, A.; MCINNES, I. Immune regulation in psoriasis and psoriatic arthritis--recent developments. **Immunology letters**, v. 114, n. 2, p. 59-65, 15 dez 2007.
- LARSEN, M.; HVIID, T. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Human immunology**, v. 70, n. 12, p. 1026-34, dez 2009.
- LI, X.; RAGHAVAN, M. Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens. **Current opinion in organ transplantation**, v. 15, n. 4, p. 499-504, ago 2010.
- LUCENA-SILVA, N.; MONTEIRO, A.; ALBUQUERQUE, R. DE; *et al.* Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. **Tissue Antigens**, v. 79, n. 4, p. 272-278, abr 2012.
- MAK, R.; HUNDHAUSEN, C.; NESTLE, F. Progress in Understanding the Immunopathogenesis of Psoriasis Progress in Understanding the Immunopathogenesis of Psoriasis. **Actas Dermosifiliogr**, v. 100, n. 2, p. 2-13, 2009.
- MEGLIO, P. DI; PERERA, G.; NESTLE, F. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 857-69, 23 dez 2011.
- MELNIKOVA, I. Psoriasis market. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 10, p. 767-768, out 2009.
- MENIER, C.; ROUAS-FREISS, N.; FAVIER, B. *et al.* Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. **Tissue antigens**, v. 75, n. 3, p. 201-6, mar 2010.
- MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 9B, p. 2973-89, set 2009.
- NEEFJES, J.; JONGSMA, M.; PAUL, P.; BAKKE, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 12, p. 823-36, dez 2011.

- NESTLE, F.; KAPLAN, D.; BARKER, J. Psoriasis: mechanisms of disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 1710, p. 496-509, 2009.
- NESTLE, F.; MEGLIO, P. DI; QIN, J.; NICKOLOFF, B. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 10, p. 679-91, out 2009.
- PARHAM, P.; NORMAN, P.; ABI-RACHED, L.; HILTON, H.; GUETHLEIN, L. Review: Immunogenetics of human placentation. **Placenta**, v. 33 Suppl, p. S71-80, fev 2012.
- PERERA, G.; MEGLIO, P. DI; NESTLE, F. Psoriasis. **Annual review of pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 385-422, jan 2012.
- RES, P.; PISKIN, G.; BOER, O. DE; *et al.* Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e14108, jan 2010.
- ROBERSON, E.; BOWCOCK, A. Psoriasis genetics: breaking the barrier. **Trends in genetics**, v. 26, n. 9, p. 415-423, set 2010.
- RUIZ, D.; AZEVEDO, M.; SANTOS, O. Psoriatic arthritis: a clinical entity distinct from psoriasis? **Revista brasileira de reumatologia**, v. 52, n. 4, p. 630-638, ago 2012.
- UJVARI, B.; BELOV, K. Major histocompatibility complex (MHC) markers in conservation biology. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 8, p. 5168-86, jan 2011.
- UROSEVIC, M. HLA-G in the skin--friend or foe? **Seminars in cancer biology**, v. 17, n. 6, p. 480-4, dez 2007.
- VALENZUELA, F.; SILVA, P.; VALDÉS, M.; PAPP, K. Epidemiology and quality of life of patients with psoriasis in Chile. **Actas dermo-sifiliográficas**, v. 102, n. 10, p. 810-6, dez 2011.
- VEIT, T.; VIANNA, P.; SCHEIBEL, I. *et al.* Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. **Tissue antigens**, v. 71, n. 5, p. 440-6, maio 2008.

APÊNDICE A – Questionário pacientes com psoríase

Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Ambulatório de Dermatologia/Psoríase – Hospital Nereu Ramos
Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no
Estado de Santa Catarina

QUESTIONÁRIO
PACIENTES COM PSORÍASE

DADOS PESSOAIS

Nome: _____ Data: _____

Idade: _____ anos SEXO: ()F ()M Ocupação: _____

Cidade onde mora: _____ Natural de: _____

Telefone para Contato: _____

Cor da Pele: ()B ()N ()M ()P ()A

DADOS FAMILIARES

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____ Profissão: _____

Ascendência: Materna _____ Paterna _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____ Profissão: _____

Ascendência: Materna _____ Paterna _____

HISTÓRICO DA DOENÇA

Tempo de doença diagnosticada: _____

Fator desencadeante: _____

Local que surgiram as primeiras lesões: _____

Classificação da doença na consulta:

() ausente () leve () moderada () grave () muito grave

Classificação PASI: _____

Padrão Morfológico:

() Vulgar () Gutata () Pustulosa () Eritrodérmica

() Palmoplantar () Invertida

Tratamento Atual:

HISTÓRICO DE DOENÇAS PESSOAIS E/OU NA FAMÍLIA

Psoríase ()S ()N Parentesco: _____

Doença de Crohn ()S ()N **Artrite** ()S ()N **DM** ()S ()N

HAS ()S ()N **Dislipidemia** ()S ()N **Depressão** ()S ()N

Hepatite ()S ()N **HIV** ()S ()N

Dermatite Tópica ()S ()N **Dermatite de Contato** ()S ()N

Outras ()S ()N Quais? _____

Observações: _____

HÁBITOS

Álcool: ()S ()N Frequência _____

Cigarro: ()S ()N Cigarros/dia: _____ Já fumou? ()S ()N

Drogas Ilícitas: ()S ()N Já usou? ()S ()N Qual? _____

Observações: _____

OUTRAS INFORMAÇÕES

TTT Medicamentoso Antes do Diagnóstico: ()S ()N

Quais? _____

TTT Hormonal Antes do Diagnóstico: ()S ()N

Qual? ()AC () Outro _____

Idade da Menarca: _____ anos **Menopausa:** ()S ()N **Idade:** _____ anos

Nº de Gestações: _____ **Nº de Filhos:** _____

PAINEL LABORATORIAL

Hemograma c/ plaquetas: _____ -

ALT/AST: _____ γ GT: _____ Fosfatase Alcalina: _____ Uréia: _____

Creatinina: _____ Ácido Úrico: _____ Colesterol Total: _____

HDL: _____ Triglicerídeos: _____ Glicose: _____ VHS: _____

Na, K, Ca, Mg: _____ Proteína C Reativa: _____

ASLO: _____ HBSAg: _____ Anti-HBS: _____ Anti-HCV: _____

Anti-HIV 1e 2: _____ FAN: _____ IgE total: _____

Observações: _____

APÊNDICE B – Questionário indivíduos-controles

Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

**QUESTIONÁRIO
INDIVÍDUOS-CONTROLES****Dados Pessoais:****Data:** __/__/__

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

Idade: _____ Sexo: ()M ()F Data de nascimento: _____

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: ()Sim ()Não

Escolaridade:

() analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo

() 2º grau incompleto () 2º grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência: Materna _____ Paterna _____

Etnia: ()Euro descendente ()Afro descendente ()Asiático descendente

()Indígena descendente

Cor da pele: () negra () mulata () amarela () branca

Observações: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência do pai: Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe: Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Possui filhos: () Sim () Não Quantos: _____

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? () Sim () Não

Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? () Sim () Não Tipo: _____

Quantidade: () menos de 30 min () 30 min () 1h () mais de 1 h

Frequência: () 1x semana () 2-3x semana () 4-6x semana () Todos os dias () Menos de 1x semana

Você **FUMA**? () Sim () Não Você já **FUMOU**? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª gestação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total (meses): _____

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? () Sim () Não Já utilizou AC? () Sim () Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: _____

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

Faz TRH? ()Sim ()Não Já fez TRH? ()Sim ()Não

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações _____

Histórico Médico

Caso de **CÂNCER** pessoal? ()Sim () Não

Tipo: _____

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? ()Sim () Não

Grau de Parentesco: () filha () irmã () mãe () avó

() tia materna 1º grau () tia paterna 1º

grau () prima materna 1º grau () prima paterna 1º grau

() Outros _____

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família? ()Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Caso de **TUMOR BENIGNO** pessoal? ()Sim ()Não

Local: _____

Caso de **DOENÇA AUTOIMUNE** pessoal? ()Sim ()Não

Qual? _____

Tempo de diagnóstico: _____

Casos de **DOENÇA AUTOIMUNE** na família? ()Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**? ()Sim ()Não

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: ()Sim ()Não **ASMA**: ()Sim ()Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: ()Sim ()Não **DENGUE**: ()Sim ()Não

OSTEOPOROSE: ()Sim ()Não **TUBERCULOSE**: ()Sim ()Não

DOENÇA REUMÁTICA: ()Sim ()Não **DIABETES**: ()Sim ()Não

HIV: ()Sim ()Não ()Nunca fez exame

HEPATITE: ()Sim ()Não ()Nunca fez exame

DISTÚRBIO RENAL: () Sim () Não

DISTÚRBIO PULMONAR: () Sim () Não

DISTÚRBIO HEPÁTICO: () Sim () Não

Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: () Sim () Não

Grau de parentesco: _____

Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: () Sim () Não

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:

APÊNDICE C – Termo de consentimento livre esclarecido

**Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Ambulatório de Dermatologia/Psoríase – Hospital Nereu Ramos
Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no
Estado de Santa Catarina**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**PACIENTES COM PSORÍASE**

Projeto de Pesquisa: “Estudo genético e epidemiológico em pacientes com psoríase no estado de Santa Catarina”.

Informações: Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados com a psoríase. Para isto pedimos sua permissão para coletarmos uma amostra de sangue sua (cerca de 10 ml) e colaboração para responder um questionário que dura aproximadamente quinze minutos. Com essa amostra, nós iremos extrair uma quantidade pequena de DNA (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (genes relacionados a células de defesa do organismo) e esta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária, não influenciando no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 e conversar com a Prof^a Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com qualquer outro participante do estudo.

Riscos: A coleta de sangue é um procedimento normal para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no

local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas e os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizados somente pela equipe da pesquisa.

Custos: Como já dissemos a sua participação nessa pesquisa é voluntária, não havendo, portanto, nem custos nem pagamento para isso.

Benefícios: Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para tratamento dessa doença, bem como para identificação de pessoas que tem risco de desenvolvê-la.

Desistência: Caso você desista de participar desse estudo, mesmo já tendo assinado esse termo, você só precisa entrar em contato com a equipe realizadora, através do telefone (48) 3721 9804, e informar a sua desistência. Nenhum tipo de penalidade lhe será aplicada.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “**Estudo genético e epidemiológico em pacientes com psoríase no estado de Santa Catarina**”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado (a) para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste projeto.

Florianópolis, _____

Assinatura: _____ RG: _____

APÊNDICE D – Termo de consentimento livre esclarecido indivíduos-controles



Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INDIVÍDUOS-CONTROLES

Projetos de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina”.

Informações: Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48)**

3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

Procedimentos: Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas. Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto. Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário conterá dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

Riscos: A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos: Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios: Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido (a) sobre as pesquisas “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis, _____

Assinatura: _____ RG: _____

APÊNDICE E – Cálculo de OR para caso (sim) controles (não)

14pb	SIM	NÃO		3003 T/C	SIM	NÃO		3010 C/G	SIM	NÃO		3027 A/C	SIM	NÃO
Del	109	112		T	116	103		C	58	59		A	6	4
In	91	88		C	14	9		G	72	55		C	67	110
OR	0,941			OR	0,724			OR	0,751			OR	2,463	
IC	0,622	1,423		IC	0,276	1,875		IC	0,439	1,283		IC	0,587	10,854
p	0,841			p	0,614			p	0,325			p	0,288	
14pb	SIM	NÃO		3003 T/C	SIM	NÃO		3010 C/G	SIM	NÃO		3027 A/C	SIM	NÃO
In	91	88		C	14	9		G	72	55		C	67	110
Del	109	112		T	116	103		C	58	59		A	6	4
OR	1,063			OR	1,381			OR	1,332			OR	0,406	
IC	0,703	1,607		IC	0,583	3,63		IC	0,779	2,277		IC	0,092	1,703
p	0,841			p	0,614			p	0,325			p	0,288	
14pb	SIM	NÃO		3003 T/C	SIM	NÃO		3010 C/G	SIM	NÃO		3027 A/C	SIM	NÃO
In/In	19	19		CC	2	2		GG	21	13		CC	59	53
l/Del + In/l	81	81		TT + CT	63	55		CC + CG	44	44		AA + AC	6	4
OR	0			OR	0,873			OR	1,615			OR	0,742	
IC	0	0		IC	0,084	9,05		IC	0,67	3,924		IC	0,165	3,194
p	1			p	1			p	0,335			p	0,91	
14pb	SIM	NÃO		3003 T/C	SIM	NÃO		3010 C/G	SIM	NÃO		3027 A/C	SIM	NÃO
In/Del	53	50		CT	10	7		CG	30	29		AC	6	4
e/Del + In/e	47	50		TT + CC	55	50		CC + CG	35	28		AA + CC	59	53
OR	1,128			OR	1,299			OR	0,828			OR	1,347	
IC	0,623	2,041		IC	0,414	4,14		IC	0,381	1,795		IC	0,313	6,069
p	0,777			p	0,817			p	0,734			p	0,91	
14pb	SIM	NÃO		3003 T/C	SIM	NÃO		3010 C/G	SIM	NÃO		3027 A/C	SIM	NÃO
Del/Del	28	31		TT	53	48		CC	14	15		AA	0,5	0,5
n/Del + In/n	72	69		CT + CC	12	9		GG + CG	51	42		AC + CC	65,5	57,5
OR	0,866			OR	0,828			OR	0,952			OR	0,878	
IC	0,45	1,662		IC	0,29	2,345		IC	0,386	2,343		IC	0,001	912,802
p	0,756			p	0,881			p	1			p	1	

3035 C/T	SIM	NÃO		3142 G/C	SIM	NÃO		3187 A/G	SIM	NÃO		3196 G/C	SIM	NÃO
C	109	98		C	68	53		A	63	66		C	54	61
T	21	16		G	62	61		G	35	30		G	34	31
OR	0,847			OR	1,262			OR	0,818			OR	0,807	
IC	0,395	1,81		IC	0,739	2,157		IC	0,431	1,552		IC	0,419	1,552
p	0,778			p	0,436			p	0,612			p	0,592	
3035 C/T	SIM	NÃO		3142 G/C	SIM	NÃO		3187 A/G	SIM	NÃO		3196 G/C	SIM	NÃO
T	21	16		G	62	61		G	35	30		G	34	31
C	109	98		C	68	53		A	63	66		C	54	61
OR	1,18			OR	0,792			OR	1,222			OR	1,239	
IC	0,552	2,531		IC	0,464	1,353		IC	0,644	2,321		IC	0,644	2,385
p	0,778			p	0,436			p	0,612			p	0,592	
3035 C/T	SIM	NÃO		3142 G/C	SIM	NÃO		3187 A/G	SIM	NÃO		3196 G/C	SIM	NÃO
TT	0,5	2,5		GG	14	16		GG	1	1		GG	3	3
CC + CT	65,5	55,5		CC + CG	51	41		AA + AG	48	47		CC + CG	41	43
OR	0,169			OR	0,703			OR	0,979			OR	1,049	
IC	0	3,397		IC	0,284	1,737		IC	0,026	36,924		IC	0,157	7,009
p	0,484			p	0,532			p	1			p	1	
3035 C/T	SIM	NÃO		3142 G/C	SIM	NÃO		3187 A/G	SIM	NÃO		3196 G/C	SIM	NÃO
CT	21	12		CG	34	29		AG	33	28		CG	28	25
CC + TT	44	45		CC + GG	31	28		AA + GG	16	20		CC + CG	16	21
OR	1,79			OR	1,059			OR	1,473			OR	1,47	
IC	0,731	4,422		IC	0,489	2,296		IC	0,594	3,669		IC	0,581	3,737
p	0,234			p	1			p	0,478			p	0,496	
3035 C/T	SIM	NÃO		3142 G/C	SIM	NÃO		3187 A/G	SIM	NÃO		3196 G/C	SIM	NÃO
CC	44	43		CC	17	12		AA	15	19		CC	13	18
CT + TT	21	14		CG + GG	48	45		AG + GG	34	29		GG + CG	31	28
OR	0,682			OR	1,328			OR	0,673			OR	0,652	
IC	0,285	1,624		IC	0,529	3,358		IC	0,267	1,69		IC	0,247	1,713
p	0,457			p	0,654			p	0,476			p	0,462	

3035 C/T	Com. Artrite	Sem Artrite	3142 G/C	Com Artrite	Sem Artrite	3187 A/G	Corn Artrite	Sem Artrite	3196 G/C	Com Artrite	Sem Artrite
C	21	88	C	17	51	A	15	48	C	17	37
T	3	18	G	7	55	G	9	26	G	7	27
OR	1,432		OR	2,619		OR	0,903		OR	1,772	
IC	0,35	6,756	IC	0,924	7,654	IC	0,315	2,609	IC	0,584	5,513
p	0,817		p	0,074		p	1		p	0,384	
3035 C/T	Com Artrite	Sem Artrite	3142 G/C	Com Artrite	Sem Artrite	3187 A/G	Corn Artrite	Sem Artrite	3196 G/C	Com Artrite	Sem Artrite
T	3	18	G	7	55	G	9	26	G	7	27
C	21	88	C	17	51	A	15	48	C	17	37
OR	0,698		OR	0,382		OR	1,108		OR	0,564	
IC	0,148	2,857	IC	0,131	1,082	IC	0,383	3,171	IC	0,181	1,712
p	0,817		p	0,074		p	1		p	0,384	
3035 C/T	Com Artrite	Sem Artrite	3142 G/C	Com Artrite	Sem Artrite	3187 A/G	Corn Artrite	Sem Artrite	3196 G/C	Com Artrite	Sem Artrite
CC	9	35	CC	7	10	AA	4	11	CC	5	8
TT + CT	3	18	GG + CG	5	43	GG + AG	8	26	GG + CG	7	24
OR	1,543		OR	6,02		OR	1,182		OR	2,143	
IC	0,321	8,27	IC	1,332	28,554	IC	0,236	5,735	IC	0,43	10,823
p	0,797		p	0,015		p	1		p	0,47	
3035 C/T	Com Artrite	Sem Artrite	3142 G/C	Com Artrite	Sem Artrite	3187 A/G	Corn Artrite	Sem Artrite	3196 G/C	Com Artrite	Sem Artrite
TT	0,5	0,5	GG	2	12	GG	1,5	0,5	GG	0,5	3,5
CC + CT	12,5	53,5	CC + CG	10	34	AA + AG	11,5	37,5	CC + CG	12,5	29,5
OR	4,28		OR	0,567		OR	9,652		OR	0,337	
IC	0,004	4603,042	IC	0,073	3,44	IC	0,294	6977,608	IC	0,001	6,651
p	1		p	0,764		p	0,423		p	0,88	
3035 C/T	Com Artrite	Sem Artrite	3142 G/C	Com Artrite	Sem Artrite	3187 A/G	Corn Artrite	Sem Artrite	3196 G/C	Com Artrite	Sem Artrite
CT	3	18	CG	3	31	AG	7	26	CG	7	21
CC + TT	9	35	CC + GG	9	22	AA + GG	5	11	CC + CG	5	11
OR	0,648		OR	0,237		OR	0,592		OR	0,733	
IC	0,121	3,12	IC	0,044	1,12	IC	0,127	2,773	IC	0,154	3,501
p	0,797		p	0,075		p	0,68		p	0,924	

APÊNDICE G – CÁLCULO DE OR PARA PACIENTES COM IDADE INFERIOR E SUPERIOR A 30 ANOS

14pb	Antes dos 30	Depois dos 30	3003 T/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3010 C/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3027 A/C	Antes dos 30	Depois dos 30
Del	43	65	T	52	64	C	29	29	A	2	4
In	43	49	C	4	10	G	27	45	C	54	70
OR	0,754		OR	2,031		OR	1,667		OR	0,648	
IC	0,413	1,375	IC	0,542	8,219	IC	0,779	3,576	IC	0,079	4,336
p	0,4		p	0,382		p	0,211		p	0,943	
14pb	Antes dos 30	Depois dos 30	3003 T/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3010 C/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3027 A/C	Antes dos 30	Depois dos 30
In	43	49	C	4	10	G	27	45	C	54	70
Del	43	65	T	52	64	C	29	29	A	2	4
OR	1,327		OR	0,492		OR	0,6		OR	1,543	
IC	0,727	2,421	IC	0,122	1,846	IC	0,28	1,284	IC	0,231	12,664
p	0,4		p	0,382		p	0,211		p	0,943	
14pb	Antes dos 30	Depois dos 30	3003 T/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3010 C/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3027 A/C	Antes dos 30	Depois dos 30
Del/Del	12	16	TT	26	27	CC	9	5	AA	0,5	0,5
In/In + In/Del	31	41	CC + CT	2	10	GG + CG	19	32	CC + AC	28,5	37,5
OR	0,992		OR	4,815		OR	3,032		OR	1,316	
IC	0,375	2,616	IC	0,853	35,407	IC	0,769	12,45	IC	0,001	1388,273
p	1		p	0,084		p	0,132		p	1	
14pb	Antes dos 30	Depois dos 30	3003 T/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3010 C/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3027 A/C	Antes dos 30	Depois dos 30
In/In	12	8	CC	2,5	0,5	GG	8	13	CC	26	33
Del/Del + In/Del	31	49	TT + CT	26,5	37,5	CC + CG	20	24	AA + AC	2	4
OR	2,371		OR	7,075		OR	0,738		OR	1,576	
IC	0,787	7,216	IC	0,338	4488,101	IC	0,223	2,414	IC	0,22	13,553
p	0,143		p	0,403		p	0,77		p	0,942	
14pb	Antes dos 30	Depois dos 30	3003 T/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3010 C/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3027 A/C	Antes dos 30	Depois dos 30
In/Del	19	33	CT	0,5	10,5	CG	11	19	AC	2	4
Del/Del + In/In	24	24	TT + CC	28,5	27,5	CC + CG	17	18	AA + CC	26	33
OR	0,576		OR	0,046		OR	0,613		OR	0,635	
IC	0,239	1,388	IC	0	0,662	IC	0,2	1,858	IC	0,074	4,536
p	0,248		p	0,013		p	0,474		p	0,942	

3035 C/T	Antes dos 30	Depois dos 30	3142 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3187 A/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3196 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30
C	50	59	C	26	42	A	27	36	C	24	30
T	6	15	G	30	32	G	15	20	G	16	18
OR	2,119		OR	0,66		OR	1		OR	0,9	
IC	0,7	6,668	IC	0,309	1,407	IC	0	0	IC	0,348	2,327
p	0,221		p	0,323		p	1		p	0,984	
3035 C/T	Antes dos 30	Depois dos 30	3142 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3187 A/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3196 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30
T	6	15	G	30	32	G	15	20	G	16	18
C	50	59	C	26	42	A	27	36	C	24	30
OR	0,472		OR	1,514		OR	1		OR	1,111	
IC	0,15	1,429	IC	0,711	3,235	IC	0	0	IC	0,43	2,874
p	0,221		p	0,323		p	1		p	0,984	
3035 C/T	Antes dos 30	Depois dos 30	3142 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3187 A/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3196 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30
CC	22	22	CC	7	10	AA	7	8	CC	6	7
TT + CT	6	15	GG + CG	21	27	GG + AG	14	20	GG + CG	14	17
OR	2,5		OR	0,9		OR	1,25		OR	1,041	
IC	0,725	8,902	IC	0,254	3,157	IC	0,311	5,029	IC	0,235	4,597
p	0,173		p	1		p	0,965		p	1	
3035 C/T	Antes dos 30	Depois dos 30	3142 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3187 A/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3196 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30
TT	0,5	0,5	GG	9	5	GG	1,5	0,5	GG	2	1
CC + CT	28,5	37,5	CC + CG	19	32	AA + AG	20,5	28,5	CC + CG	18	23
OR	1,316		OR	3,032		OR	4,171		OR	2,556	
IC	0,001	1388,273	IC	0,769	12,45	IC	0,132	2967,905	IC	0,16	77,025
p	1		p	0,132		p	0,842		p	0,87	
3035 C/T	Antes dos 30	Depois dos 30	3142 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30	3187 A/G	Antes dos 30	Depois dos 30	3196 G/C	Antes dos 30	Depois dos 30
CT	6	15	CG	12	22	AG	13	20	CG	12	16
CC + TT	22	22	CC + GG	16	15	AA + GG	8	8	CC + CG	8	8
OR	0,4		OR	0,511		OR	0,65		OR	0,75	
IC	0,112	1,378	IC	0,167	1,5	IC	0,165	2,544	IC	0,183	3,058
p	0,173		p	0,282		p	0,692		p	0,887	

APÊNDICE H – Cálculo de OR para pacientes com e sem histórico familiar de psoríase

14pb	SIM	NÃO	3003 T/C	SIM	NÃO	3010 C/G	SIM	NÃO	3027 A/C	SIM	NÃO
Del	50	59	T	52	64	C	25	33	A	3	3
In	38	53	C	4	10	G	31	41	C	53	71
OR	1,182		OR	2,031		OR	1,002		OR	1,34	
IC	0,648	2,156	IC	0,542	8,219	IC	0,469	2,138	IC	0,205	8,748
p	0,659		p	0,382		p	1		p	1	
14pb	SIM	NÃO	3003 T/C	SIM	NÃO	3010 C/G	SIM	NÃO	3027 A/C	SIM	NÃO
In	38	53	C	4	10	G	31	41	C	53	71
Del	50	59	T	52	64	C	25	33	A	3	3
OR	0,846		OR	0,492		OR	0,998		OR	0,746	
IC	0,464	1,542	IC	0,122	1,846	IC	0,468	2,13	IC	0,114	4,871
p	0,659		p	0,382		p	1		p	1	
14pb	SIM	NÃO	3003 T/C	SIM	NÃO	3010 C/G	SIM	NÃO	3027 A/C	SIM	NÃO
Del/Del	15	13	TT	24	29	CC	7	7	AA	0,5	0,5
In/In + In/Del	29	43	CC + CT	4	8	GG + CG	21	30	CC + AC	28,5	37,5
OR	1,711		OR	1,655		OR	1,429		OR	1,316	
IC	0,651	4,522	IC	0,383	7,567	IC	0,376	5,457	IC	0,001	1388,273
p	0,328		p	0,665		p	0,775		p	1	
14pb	SIM	NÃO	3003 T/C	SIM	NÃO	3010 C/G	SIM	NÃO	3027 A/C	SIM	NÃO
In/In	5	10	CC	0,5	2,5	GG	10	11	CC	25	34
Del/Del + In/In	35	46	TT + CT	28,5	35,5	CC + CG	18	26	AA + AC	3	3
OR	1,183		OR	0,249		OR	1,313		OR	0,735	
IC	0,389	3,589	IC	0	5,221	IC	0,407	4,248	IC	0,106	5,098
p	0,943		p	0,722		p	0,808		p	1	
14pb	SIM	NÃO	3003 T/C	SIM	NÃO	3010 C/G	SIM	NÃO	3027 A/C	SIM	NÃO
In/Del	20	33	CT	4	6	CG	11	19	AC	3	3
Del/Del + In/In	24	23	TT + CC	24	31	CC + CG	17	18	AA + CC	25	34
OR	0,581		OR	0,861		OR	0,613		OR	1,36	
IC	0,242	1,389	IC	0,178	4,015	IC	0,2	1,858	IC	0,196	9,441
p	0,255		p	1		p	0,474		p	1	

3035 C/T	SIM	NÃO	3142 G/C	SIM	NÃO	3187 A/G	SIM	NÃO	3196 G/C	SIM	NÃO
C	45	64	C	30	38	A	29	34	C	26	28
T	11	10	G	26	36	G	15	20	G	12	22
OR	0,639		OR	1,093		OR	1,137		OR	1,702	
IC	0,227	1,791	IC	0,514	2,326	IC	0,456	2,845	IC	0,645	4,534
p	0,484		p	0,942		p	0,928		p	0,335	
3035 C/T	SIM	NÃO	3142 G/C	SIM	NÃO	3187 A/G	SIM	NÃO	3196 G/C	SIM	NÃO
T	11	10	G	26	36	G	15	20	G	12	22
C	45	64	C	30	38	A	29	34	C	26	28
OR	1,564		OR	0,915		OR	0,879		OR	0,587	
IC	0,558	4,403	IC	0,43	1,945	IC	0,352	2,193	IC	0,221	1,551
p	0,484		p	0,942		p	0,928		p	0,335	
3035 C/T	SIM	NÃO	3142 G/C	SIM	NÃO	3187 A/G	SIM	NÃO	3196 G/C	SIM	NÃO
CC	17	27	CC	9	8	AA	8	7	CC	8	5
TT + CT	11	10	GG + CG	19	29	GG + AG	14	20	GG + CG	11	20
OR	0,572		OR	1,717		OR	1,633		OR	2,909	
IC	0,176	1,85	IC	0,493	6,04	IC	0,409	6,609	IC	0,64	13.802
p	0,436		p	0,502		p	0,633		p	0,209	
3035 C/T	SIM	NÃO	3142 G/C	SIM	NÃO	3187 A/G	SIM	NÃO	3196 G/C	SIM	NÃO
TT	0,5	0,5	GG	7	7	GG	1	0	GG	1	2
CC + CT	28,5	37,5	CC + CG	21	30	AA + AG	21	27	CC + CG	18	23
OR	1,316		OR	1,429		OR	0,613		OR	0,639	
IC	0,001	1388.273	IC	0,376	5,457	IC	0,151	2,447	IC	0,0021	10,242
p	1		p	0,775		p	0,633		p	1	
3035 C/T	SIM	NÃO	3142 G/C	SIM	NÃO	3187 A/G	SIM	NÃO	3196 G/C	SIM	NÃO
CT	11	10	CG	12	22	AG	13	20	CG	10	18
CC + TT	17	27	CC + GG	16	15	AA + GG	9	7	CC + CG	9	7
OR	1,747		OR	0,511		OR	0,506		OR	0,432	
IC	0,541	5,697	IC	0,167	1,55	IC	0,126	1,984	IC	0,101	1,794
p	0,436		p	0,282		p	0,42		p	0,315	

