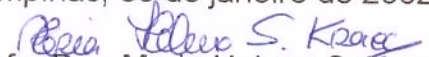


CLÁUDIA BUENO CARDOSO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas da aluna **Cláudia Bueno Cardoso**.

Campinas, 30 de janeiro de 2002.


Profa. Dra. Maria Helena S. Kraemer
Orientadora

***ALELOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE DE CLASSE II
ASSOCIADOS AO PERFIL IMUNOGENÉTICO DE
INDIVÍDUOS PORTADORES DE PSORÍASE VULGAR***

CAMPINAS

2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CLÁUDIA BUENO CARDOSO

***ALELOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE DE CLASSE II
ASSOCIADOS AO PERFIL IMUNOGENÉTICO DE
INDIVÍDUOS PORTADORES DE PSORÍASE VULGAR***

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, área de
Ciências Biomédicas*

Orientadora: Prof. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer

CAMPINAS

2002

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C179a
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49688
PROC 16-837/02
C _____ D~~x~~ _____
PREÇO R\$11,00
DATA 15/06/02
Nº CPD _____

CM00169250-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

BIB ID 243552

C179da

Cardoso, Cláudia Bueno

Alelos de histocompatibilidade de classe II associados ao perfil imunogenético de indivíduos portadores de Psoríase Vulgar. / Cláudia Bueno Cardoso. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Maria Helena Stangler Kraemer

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Complexo principal de histocompatibilidade. 2. Biologia molecular. 3. Psoríase. I. Maria Helena Stangler Kraemer. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena S. Kraemer

Membros:

1.

2.

3.

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

2022 6/12

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a meus pais Alceu e Dalva,
a minha irmã Sandra e a meu namorado Edson,
que sabem a importância de suas vidas em minha
vida.*

Este trabalho recebeu recursos financeiros para uma bolsa de mestrado e apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo- FAPESP.

Agradeço, especialmente, à minha orientadora Prof. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer, pelo estimulante apoio, pelas importantes sugestões e pela ajuda para a elaboração desta pesquisa. Serei eternamente grata e levarei comigo seus ensinamentos, no decorrer da minha carreira profissional.

Agradeço a minha co-orientadora, Profa. Dra. Ana Maria Uthida-Tanaka pela sua brilhante coorientação clínica; meus sinceros agradecimentos pela atenção e carinho despendido em todo o período.

Aos pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa, contribuindo com a Ciência.

Aos queridos amigos do Laboratório de Imunogenética de Transplantes da Unicamp: Arthur, Ana Cristina, Margareth e Vera, que me proporcionaram amizade, apoio, estímulo e compreensão nas horas difíceis, pela atenção que sempre me dispensaram, bem como pela colaboração na parte técnica do trabalho. Sem a participação dessas pessoas de tanto valor, seria impossível a concretização desse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta e ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, pelas importantes correções e sugestões dadas na elaboração final da tese.

À querida Noélia, funcionária do Laboratório de Imunogenética de Transplantes, pela ajuda, consideração e amizade.

Ao Hospital das Clínicas, pelo suporte e infra-estrutura para a realização dessa tese.

Ao Marcelo, funcionário da Biosystems, pela ajuda na parte prática desse trabalho.

À Renata Ferreira Magalhães, pela colaboração e ajuda na obtenção dos pacientes desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Magna, por ter aplicado seus conhecimentos em estatística nesse trabalho.

Ao Hallison, diretor da Biosystems, que me concedeu a oportunidade de participar do Workshop Técnico Micro SSPTM, realizado em Curitiba/PR.

Às minhas queridas amigas Ártemis e Regina, pela amizade que me proporcionaram nesse período.

A meus pais Alceu e Dalva, meus grandes incentivadores e dignos de admiração, pela constante presença, bondade e lição de vida.

À minha querida irmã Sandra, pela atenção e colaboração em todos os momentos.

A meu namorado Edson, pelo carinho e apoio dispensados durante a realização da tese.

A Deus, que me deu saúde e me fez forte para vencer os obstáculos encontrados durante esta etapa da minha vida.

Em nosso esforço pra compreender a realidade somos semelhantes a um homem tentando compreender o mecanismo de um relógio fechado. Ele vê o mostrador e os ponteiros em movimento, até ouve o seu tique-taque, mas não tem meio algum de abrir a caixa. Se for engenhoso, poderá formar alguma imagem de um mecanismo que poderia ser responsável por todas as coisas que observa, mas jamais poderá estar certo de que sua imagem seja a única capaz de explicar suas observações.

Albert Einstein e Leopold Infeld

	PÁG
RESUMO.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1. Antígenos leucocitários humanos (HLA) e a histocompatibilidade nos transplantes.....	35
1.1.1. A organização dos genes no complexo HLA.....	36
1.1.2. Moléculas HLA de classe I- Proteínas e genes.....	39
1.1.3. Moléculas HLA de classe II- Proteínas e genes.....	40
1.1.4. Moléculas HLA de classe I e II e apresentação de peptídeos antigênicos para diferentes tipos de células.....	41
1.2. Alelos HLA e herança dos alelos de classe II.....	43
1.3. HLA e associação com doenças.....	46
1.4. A patogênese da Psoríase : aspectos imunológicos.....	48
1.4.1. Hipótese na patogênese da Psoríase.....	51
1.4.2. Interações das células T e queratinócitos.....	53
1.4.3. Superantígenos.....	55
1.4.4. Aspectos genéticos e imunogenéticos.....	56
2. OBJETIVOS.....	61
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.1. Caracterização dos indivíduos da pesquisa.....	68
3.1.1. Seleção dos indivíduos controle.....	68
3.1.2. Seleção dos pacientes.....	69
3.2. Tipificação dos genes HLA de classe II.....	70
3.2.1. Extração e purificação do DNA.....	70

3.2.2. Amplificação do gene, utilizando a reação de polimerase em cadeia (Polymerase chain Reaction- PCR).....	71
3.3. Análise do DNA amplificado.....	74
3.3.1. Fotodocumentação e interpretação dos resultados da tipificação por DNA.....	75
3.3.2. Associação e definição dos alelos HLA de tipificação por DNA.....	76
3.4. Análise estatística.....	77
4. RESULTADOS.....	81
4.1. Tipificações dos alelos HLA-DRB1-5 e DQB1 em pacientes com Psoríase Vulgar e nos controles sadios.....	83
4.2. Frequências alélicas e gênicas detectadas por PCR/SSP em paciente com Psoríase Vulgar e nos controles sadios.....	83
4.3. Associação com os alelos HLA-DRB1 e DQB1.....	88
4.4. Associação com os haplótipos HLA-DRB1 e DQB1.....	91
5. DISCUSSÃO.....	97
5.1. Alelos HLA-DRB1/DQB1 em controles sadios.....	99
5.2. Alelos HLA-DRB1/DQB1 na Psoríase Vulgar.....	101
5.2.1. Associação positiva de alelos DRB1 e haplótipos DRB1/DQB1.....	102
5.2.2. Frequência diminuída dos alelos HLA-DRB1 e haplótipos HLA/DRB1/DQB1.....	103
5.3. Haplótipos HLA-DRB1/DQB1 e a manifestação precoce da doença.....	103
6. CONCLUSÃO.....	105
7. SUMMARY.....	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
9. APÊNDICE.....	131

	PÁG
Tabela 1. Distribuição das freqüências antigênicas e gênicas - HLA-DR e HLA-DQ nos pacientes com Psoríase Vulgar e no grupo controle.....	84
Tabela 2. Distribuição das freqüências antigênicas e gênicas HLA-DRB1 nos pacientes com Psoríase Vulgar e no grupo controle.....	86
Tabela 3. Significância estatística dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 associados com a Psoríase Vulgar.....	89
Tabela 4. Significância estatística dos alelos HLA-DRB1 associados com a Psoríase Vulgar.....	90
Tabela 5. Freqüências dos haplótipos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 nos pacientes com Psoríase Vulgar e no grupo controle.....	92
Tabela 6. Significância estatística dos haplótipos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 nos pacientes com Psoríase Vulgar e no grupo controle.....	94
Tabela 7. Associações positivas observadas para os alelos e haplótipos HLA-DRB, -DQB1, detectadas por SSP nos pacientes com Psoríase Vulgar.....	96
Tabela 8. Associações negativas observadas para os alelos e haplótipos HLA-DRB1 e DQB1, detectadas por SSP nos pacientes com psoríase Vulgar.....	96

	PÁG
Figura 1: Mapa simplificado do complexo HLA.....	37
Figura 2: Mapa simplificado da região de classe I.....	37
Figura 3: Mapa simplificado da região de classe II.....	38
Figura 4: Esquema da estrutura da molécula HLA de classe I.....	39
Figura 5: Esquema da estrutura da molécula HLA de classe II.....	40
Figura 6: Apresentação de peptídeos antigênicos às células T.....	41
Figura 7: Polimorfismo dos alelos HLA.....	43
Figura 8: Representação dos exons da molécula HLA de classe II. L-peptídeo líder; TM-região transmembrânica; CYT-final citoplasmático.....	44
Figura 9: Nomenclatura dos alelos HLA.....	44
Figura 10: Expressão da codominância dos antígenos HLA.....	45
Figura 11: Representação da herança dos alelos HLA.....	46
Figura 12: Estrutura do DNA.....	70
Figura 13: Amplificação por PCR.....	71
Figura 14: Desnaturação.....	73
Figura 15: Anelamento dos “primers”.....	73
Figura 16: Extensão.....	73
Figura 17: Representação de “primer” específico.....	75



RESUMO

Nesta tese, foram analisados 100 indivíduos-controle sadios, da população de Campinas- Sudeste do Brasil, e 60 indivíduos com Psoríase Vulgar da mesma região geográfica.

As tipificações dos alelos HLA de classe II (HLA-DRB1-5 – DQB1) foram efetuadas através do método molecular por DNA/PCR/SSP, para média e alta resolução. O DNA foi extraído por um procedimento “Salting out”, do sangue periférico de cada indivíduo componente da pesquisa. Utilizando-se a técnica da PCR/SSP por “primers” da One Lambda, foram quantificados um total de 13 alelos DRB1, 3 alelos DRB3, 1 alelo DRB4, 2 alelos DRB5 e 5 alelos DQB1 em média resolução ou genérica; e 45 alelos DRB1 em alta resolução ou resolução específica, nos pacientes analisados.

A análise dos resultados mostrou associações positivas, indicando susceptibilidade à Psoríase Vulgar, com os alelos- HLA-DRB3*02 ($p<0,05$, $\chi^2= 4,36$, RR= 2,14) e HLA-DRB1*0102 ($p<0,05$, RR= 5,44). E associações negativas indicando proteção à Psoríase Vulgar, com os alelos, HLA-DRB4*01 ($p<0,001$, $\chi^2= 6,55$, RR= 0,53) e HLA-DRB1*1302 ($p< 0,05$, RR= 0,23).

A análise efetuada nos haplótipos, revelou associações positivas para: HLA-DRB1*0102/DQB1*05 ($p<0,05$, RR= 5,44) e HLA-DRB1*0701/DQB1*03 ($p<0,02$, RR=9,00).

Os achados permitem definir a população-controle estudada como caucasóide miscigenada, e sugerem uma possível associação com o alelo DRB1 e o grupo de pacientes com início precoce da doença. No entanto, estes dados devem ser confirmados em estudos futuros.



1. INTRODUÇÃO

1.1. ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA) E A HISTOCOMPATIBILIDADE NOS TRANSPLANTES

Aproximadamente, há cem anos atrás, biólogos interessados em câncer começaram a estudar os tumores que, algumas vezes espontaneamente, apareciam nos camundongos domésticos. Como cada tumor morria com o camundongo no qual ele aparecia, os pesquisadores passaram a transplantar tumores de camundongos doentes para camundongos saudáveis. Nesse caminho foi possível prolongar as investigações em termos de tempo de vida de um só camundongo. Na grande maioria, esses tumores transplantados não se desenvolviam nos camundongos saudáveis e eram rejeitados por mecanismos, mais tarde conhecidos como de resposta imune (GORER, 1937). Estudos posteriores desse fenômeno se tornaram-se possíveis pela produção de linhagens consanguíneas “inbred” de camundongos, e linhagens geneticamente homogêneas. Constatou-se que tecidos transplantados entre camundongos de mesma linhagem genética eram aceitos, enquanto os transplantes entre camundongos de linhagens diferentes eram sempre rejeitados (SNELL, 1968). Experimentos posteriores, cruzando linhagens consanguíneas foram efetuados a fim de definir o número de locos genéticos que contribuíam para a rejeição dos tecidos e foi constatado que, somente um loco tinha um efeito forte, enquanto 10 a 20 outros locos também contribuíam. A esse grupo de fatores genéticos denominou-se locos de histocompatibilidade, uma vez que eles determinaram compatibilidade teciduais. O loco dominante foi chamado de complexo principal de histocompatibilidade, enquanto os outros foram coletivamente chamados de locos secundários de histocompatibilidade (KLEIN & SHEREFFLER, 1971; TERASAKI & GJERTSON, 1997).

Atualmente, os estudos sobre os antígenos de histocompatibilidade têm sido concentrados nas células do sangue, uma vez que, historicamente foi constatada a expressão de antígenos HLA de classe I na grande maioria das células brancas dos camundongos, enquanto uma minoria expressava antígenos de classe II. Nos camundongos, tanto eritrócitos (células vermelhas do sangue) como leucócitos (células brancas do sangue) expressam antígenos HLA de classe I (SNELL, 1968). Embora eritrócitos humanos não expressem antígenos HLA de classe I, eles são expressos na totalidade dos leucócitos humanos. Por essa razão, os antígenos do complexo principal de histocompatibilidade

foram denominados de antígenos leucocitários humanos, usualmente abreviados de HLA e a definição HLA é usada para designar tanto aloantígenos de classe I como de classe II (BODMER *et al.*, 1984). As diferenças estruturais na expressão das moléculas HLA de classe I e classe II entre receptores e doadores nos transplantes, constituem os estímulos mais importantes da rejeição e demais respostas imunes e alorreatividade nos transplantes clínicos (DAUSSET, 1981). Sob essas diferenças, reside um extenso e complicado polimorfismo genético o qual assegura a herança, a expressão e as diferentes combinações dos alelos de classe I e classe II nos humanos. A proteína codificada por um alelo é denominada de aloantígeno e a combinação de aloantígenos de classe I e II expressas por um indivíduo é denominada de tipagem HLA (KISSMEYER & DICK, 1979).

A tipagem HLA foi tradicionalmente determinada, usando ensaios sorológicos realizados em leucócitos purificados do sangue periférico. Esses experimentos determinam diferenças antigênicas entre os possíveis aloantígenos e definem a tipagem HLA com relação a uma série de antígenos. Quando métodos bioquímicos e de biologia molecular foram usados para estudar diferentes especificidades HLA, constatou-se limitações com relação aos ensaios sorológicos. Dessa forma, gradualmente as técnicas de tipagem sorológica foram substituídas por métodos mais precisos, fundamentados na tipificação do DNA genômico e na determinação da seqüência dos alelos. No momento, o uso da tipificação HLA em estudos clínicos se encontra em um período de grande desenvolvimento (ROOD *et al.*, 1991; PARHAM *et al.*, 1988; PARHAM & OHTA, 1996).

1.1.1. A organização dos genes no complexo HLA

Os genes que codificam os aloantígenos HLA de classe I e II estão intimamente ligados entre si no braço curto do cromossomo 6. Esta parte do genoma constitui o complexo principal de histocompatibilidade (Fig. 1), também geralmente conhecido pela sigla em inglês MHC (Major Histocompatibility Complex), sendo denominado na espécie humana de sistema HLA (Human Leucocyte Antigen). O complexo HLA tem cerca de 4 milhões de pares de bases (pb) o equivalente a 0,1% do genoma humano, englobando mais de cem genes (CAMPBELL & TROWSDALE, 1993), podendo ser subdivididos em 3 regiões:

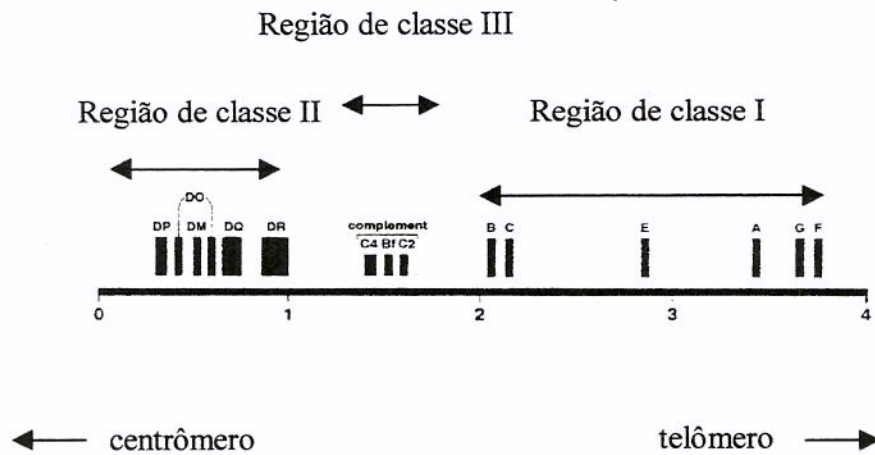


Figura 1: Mapa simplificado do complexo HLA

a) Na parte mais telomérica do cromossomo 6 estão localizados os genes HLA de classe I, e codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA -A, -B e -C (Fig. 2). Ainda incluindo nessa região, estão os pseudogenes, ou seja, genes que não se expressam nas moléculas funcionais, HLA-H,-G,-J,-K,-L. As moléculas de classe I (HLA-E, HLA-G) são expressas em tecidos específicos e em tempos específicos. Por exemplo, a molécula HLA-G é expressa na interface materno/fetal. Essas moléculas são menos polimórficas que as moléculas HLA-A, -B,-C, mas também consideradas importantes para a compatibilidade HLA (PARHAM & OHTA, 1996). Os genes da família MIC, constituídos por 5 genes: MICA, MICB, MICC, MICD e MICE e sendo que, somente os genes MICA e MICB são expressos nas superfícies das células (GRUEN, NALABOLU, SHU, 1996).

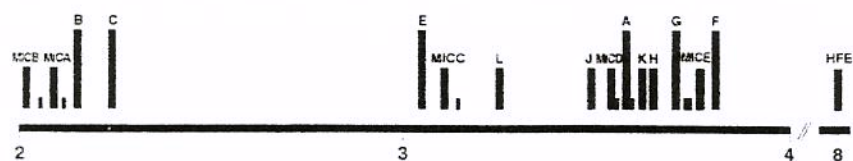


Figura 2: Mapa simplificado da região de classe I

b) Na sub-região HLA-DR, os genes se apresentam divididos em três categorias: os genes que codificam as cadeias α e β das moléculas HLA de classe II, os pseudogenes relacionados às cadeias gênicas α e β , e os genes envolvidos no processamento e apresentação do antígeno pelas moléculas HLA de classe II. Nesta última, estão diversos genes (Fig. 3), como o HLA-DRA, que codifica a cadeia α não polimórfica e os genes HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 e DRB5 respectivamente (ANDERSON, LARHAMMAR, WIDMARK, 1987). Nas sub-regiões HLA-DQ e DP, encontram-se os genes HLA-DQA1 e -DPB1 (JONSSON, HYLDIG-NIELSEN, SERVENIUS, 1987).

A região de classe II também possui outros genes como os TAP e os LMT. Os genes TAP1 e TAP2 codificam proteínas responsáveis pelo transporte até o retículo endoplasmático dos peptídeos gerados no citosol (TOWNSEND & TROWSDALE, 1993). Os genes LMP2 e LMP7 codificam os componentes do proteossoma, responsáveis pela geração dos peptídeos (GLYNNE, POWIS, BECK, 1991). Os genes HLA-DM, codificadores das moléculas HLA-DMA e DMB, codificam as moléculas que catalizam a ligação de peptídeos às moléculas HLA de classe II (CHO, AHAYA, MONACO, 1991).

c) Dentro da região de classe III, situam-se os genes que codificam algumas proteínas do Sistema Complemento, C2, C4, da via clássica e o fator B da via alternativa do Sistema Complemento (LEHNER & TROWSDALE, 1998; BAHRAM *et al.*, 1994).

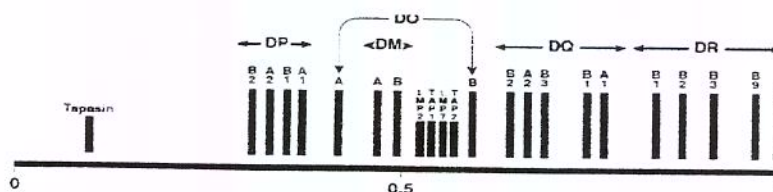


Figura 3: Mapa simplificado da região de classe II

Os genes que codificam as cadeias α do complexo HLA de classe I e as cadeias α e β do complexo HLA de classe II estão ligados, isto é, além de estarem no mesmo cromossomo, estão próximos o suficiente para serem transmitidos juntos. Uma combinação particular dos alelos, de diferentes locos do complexo HLA, é denominada haplótipo (JANEWAY *et al.*, 1997). E outra característica dos genes HLA é o desequilíbrio de

ligação, isto é, para preservar determinados haplótipos, a frequência observada de um dado alelo é maior que a esperada por combinação de alelos ao acaso. Um exemplo na população caucasóide é o haplótipo HLA-A1 e HLA-B8 cuja frequência do gene individual é de 27,5% e 15,7% respectivamente, e a frequência esperada dos dois alelos para o mesmo cromossomo é de 4,3%. No entanto, este haplótipo aponta uma frequência de 9,8% no cromossomo 6, indicando uma alta frequência de recombinação entre HLA-A e HLA-B (FEDER, GNIRKE, THOMAS, 1996).

1.1.2. Moléculas HLA de classe I – Proteínas e genes

As moléculas HLA de classe I são constituídas por dois polipeptídeos: a glicoproteína de cadeia pesada de 45 Kda que se encontra ancorada na membrana de célula e a cadeia leve solúvel em água de 12 KDa – a Beta 2 microglobulina (BODMER *et al.*, 1997).(Fig. 4)

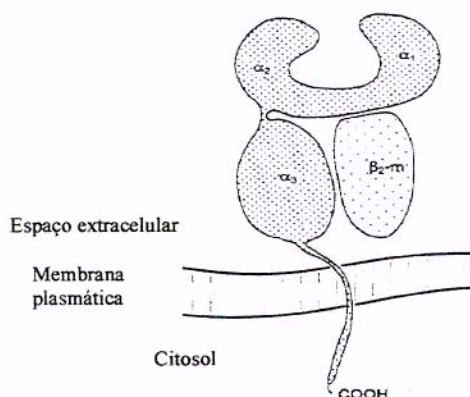


Figura 4: Esquema da estrutura da molécula HLA de classe I

A cadeia leve é usualmente chamada de $\beta 2$ - microglobulina por ter sido inicialmente caracterizada como um componente solúvel de urina e do soro e assim denominada pela sua mobilidade eletroforética relativa a outras proteínas no soro (BJORKMAN & PARHAM, 1990).

A β_2 – micrôglobulina é codificada por um gene no cromossomo 15 e para a qual não foi descoberta variação de polimorfismo na expressão da proteína. Os genes que codificam as cadeias pesadas dos antígenos HLA de classe I possuem uma estrutura característica em que diferentes domínios de proteínas são codificados por éxons separados: o peptídeo líder é codificado pelo éxon 1, os três domínios extracelulares (α_1 , α_2 e α_3), são codificados pelos éxons 2, 3 e 4 respectivamente, a âncora transmembrana é codificada pelo éxon 5, o final citoplasmático pelos éxons 6 e 7, e a região 3 (linha) não lida, pelo éxon 8. (PARHAM *et al.*, 1988; PARHAM & OHTA, 1996). No total, os éxons dos genes de classe I da cadeia leve são constituídos de 1089-1101 nucleotídeos (MARSH, PARHAM, BARKER, 2000b).

1.1.3. Moléculas HLA de classe II- Proteínas e genes

As moléculas HLA de classe II são constituídas das cadeias α e β , cada uma tendo 2 domínios extracelulares (Fig. 5).

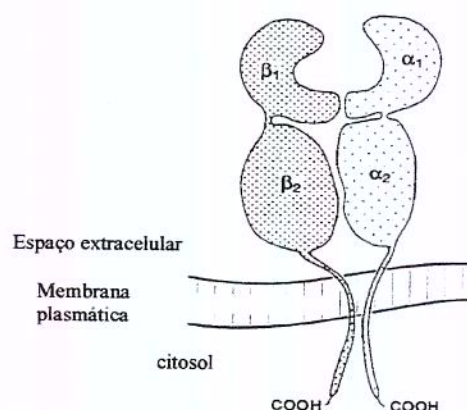


Figura 5: Esquema da estrutura da molécula HLA de classe II

Os domínios extracelulares da cadeia α são denominados α_1 e α_2 (33-35 KDa), e os da cadeia β são β_1 e β_2 (26-28 KDa) não são associadas covalentemente. A sequência das duas cadeias indica que cada uma possui dois domínios de membrana externa de aproximadamente 90 aminoácidos, e a região transmembrana e o domínio citoplasmático

com aproximadamente 40 aminoácidos. A cadeia β contém duas pontes dissulfeto intracadeia, e a cadeia α uma única ponte dissulfeto intracadeia (STERN, BROWN, JARDETZKY, 1994). A organização éxon- íntron dos genes de classe II é similar aos genes de classe I, onde os éxons codificam domínios separados de proteínas. Os genes da cadeia α e β , têm estruturas similares em que o éxon 1 codifica o peptídeo líder, e os éxons 2 e 3 codificam os dois domínios extracelulares. Nos genes da cadeia β , o éxon 4 codifica o domínio transmembrana, e o éxon 5 codifica o final citoplasmático. Por outro lado, para os genes da cadeia α , ambas as regiões transmembrana e o final citoplasmático são codificados pelo éxon 4 (TROWSDALE & KELLY, 1985). O polimorfismo das moléculas HLA de classe II podem formar-se de ambas as cadeias α e β , porém, para o gene HLA-DR a cadeia α é monomórfica e todo o polimorfismo origina-se dos genes da cadeia β . O mais polimórfico dos genes HLA de classe II é o HLA-DRB1 para o qual 221 alelos já foram definidos, e para os genes HLA-DR e HLA-DQ tanto a cadeia α como a cadeia β , contribuem para o polimorfismo (CEREB *et al.*, 1996).

Até o momento um total de 746 alelos de classe I e 542 alelos de classe II foram definidos (MARSH *et al.*, 2001).

1.1.4. Moléculas HLA de classe I e II e apresentação de peptídeos antigênicos para diferentes tipos de células

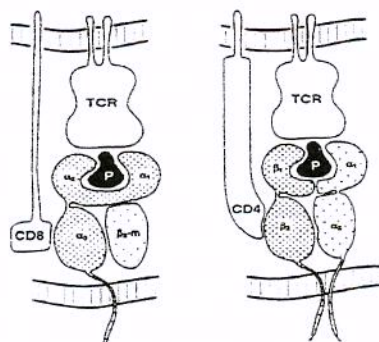


Figura 6: Apresentação de peptídeos antigênicos às células T

As moléculas HLA de classe I e II são moléculas do Sistema Imune, essenciais na imunidade adaptativa mediada pelas células T. As moléculas HLA de classe I e II apresentam peptídeos antigênicos para os receptores de células α e β de célula TCD8 e célula TCD4, respectivamente. Os receptores de célula T interagem com a superfície da molécula de classe I, constituídas pelos domínios α_1 e α_2 e o peptídeo de ligação. De maneira similar, os peptídeos de células T interagem com a superfície de moléculas de classe II, formados pelos domínios α_1 , β_1 e peptídeo de ligação. Os co-receptores CD8 e CD4 interagem com moléculas HLA de classe I e II, respectivamente (Fig. 6). Os sítios de ligação nas moléculas HLA pelos co-receptores são distintos dos sítios de ligação pelos receptores de células T. O sítio de ligação do CD8 com a molécula de classe I é o domínio α_3 , sendo que o sítio de interação do CD4 com a molécula HLA de classe II é o domínio β_2 . Uma ativação eficiente das células T, necessita da interação simultânea da molécula de HLA com o peptídeo antigênico, o receptor de célula T e o co-receptor (GOLDBERG & ROCK, 1992).

Em geral, os antígenos externos, apresentados pelas moléculas de classe I, são derivados de infecções intracelulares provavelmente causadas por vírus. Esses antígenos iniciam as respostas citolíticas das células T-CD8 as quais destroem as células infectadas e previnem a replicação viral e a propagação à infecção. Uma vez que todas as células nucleadas são alvos potenciais para infecções virais, as moléculas de classe I são expressas por quase todos os tipos de células (WIERTZ, MUKHERJEE, PLOEGH, 1997).

Em geral, os antígenos externos apresentados pelas moléculas de classe II, são derivados de patógenos presentes nos espaços extracelulares; isto inclui organismos que vivem e se replicam nos espaços extracelulares, por exemplo, muitas bactérias que se locomovem entre as células, estes antígenos estimulam respostas de células T-CD4, que servem para ativar macrófagos e células B. Esse modo de apresentação do antígeno não é necessário para todos os tipos de células, assim moléculas HLA de classe II são seletivamente expressas em células especializadas para esse fim e coletivamente denominadas células apresentadoras de antígenos (APC). Macrófagos, células B e células dendríticas são as mais importantes APCs (CASTELLINO, ZHONG, GERMAIN, 1997).

1.2. ALELOS HLA E HERANÇA DOS ALELOS DE CLASSE II

1- Os genes HLA são altamente polimórficos (muitas formas), sendo assim, os genes HLA de indivíduos não relacionados de uma grande população humana, tem seqüências diferentes de DNA para esse gene. Cada seqüência diferente de DNA é chamada de alelo. Essas diferentes seqüências gênicas originam diferentes produtos alélicos (polipeptídeos) para as diferentes proteínas de classe II, onde:

A) Alguns locos formam muitos alelos, são muito polialélicos, por exemplo, o loco DRB1 tem aproximadamente 200 alelos. Outros locos apresentam poucos alelos, como o DRA com apenas 2 alelos.

- É pouco provável que dois indivíduos não relacionados carreguem os mesmos alelos de classe II para os locos, DR, DQ e DP (Fig. 7); a estimativa esperada é que somente um indivíduo para cada 20.000 de um grupo étnico, carregue os mesmos alelos HLA de outro indivíduo deste mesmo grupo.

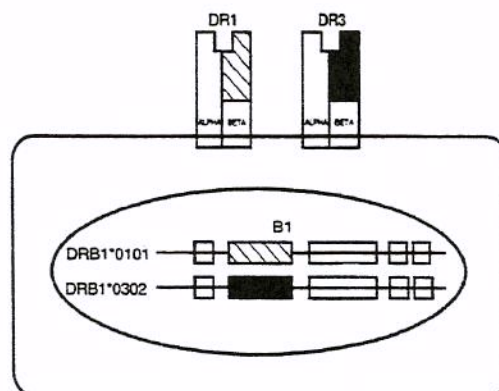


Figura 7: Polimorfismo dos alelos HLA

2- Nos alelos de classe II, o segundo éxon que codifica o primeiro domínio de cada cadeia de polipeptídeo, contém a grande maioria da variabilidade alélica. Diferenças alélicas podem, também, ser encontradas em outros éxons. As tipagens HLA de classe II definem as diferenças, basicamente, no segundo éxon (Fig. 8).

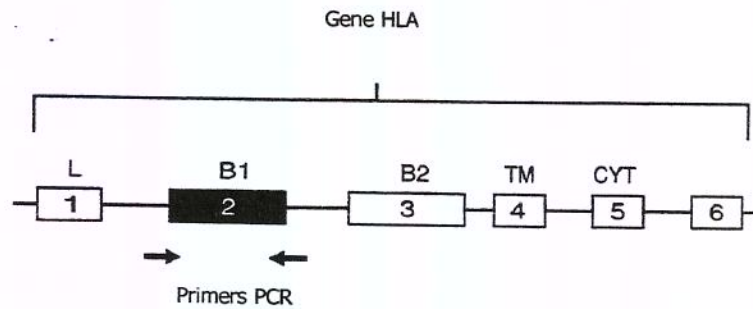


Figura 8: Representação dos exons da molécula HLA de classe II. L-peptídeo líder; TM- região transmembrânica; CYT- final citoplasmático

3- O Comitê para nomenclatura dos fatores HLA- W.H.O, define os nomes para os alelos HLA. Por exemplo, alelos do loco DRB1 são chamados: DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0403.

- Cada alelo HLA é designado pelo nome de gene ou loco seguido por um asterisco e um número com 4 dígitos indicando o alelo (Fig. 9).

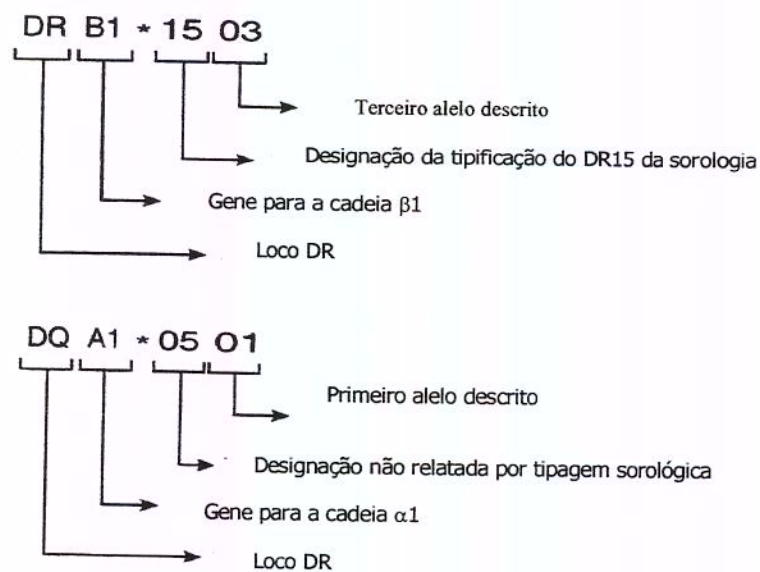


Figura 9: Nomenclatura dos alelos HLA

- Por exemplo, DQB1*0301 é um alelo do gene HLA-DQB. Os dois primeiros números na designação numérica de cada alelo é o equivalente à definição sorológica. Os outros dois números se referem ao gene determinado.

- Cada indivíduo carrega duas cópias do gene alfa α ou beta β - HLA-DR,-DQ,-DP, uma herdada de sua mãe e uma de seu pai. Além disso, todos os genes HLA são encontrados em um só cromossomo, cada indivíduo herda uma cópia do cromossomo 6, carregando uma cópia do haplótipo HLA de sua mãe e uma cópia do haplótipo HLA de seu pai.

- Os genes HLA são co-dominantemente expressos, isto é, ambas as cópias codificam proteínas que são expressas na membrana celular em uma célula. (Fig. 10).

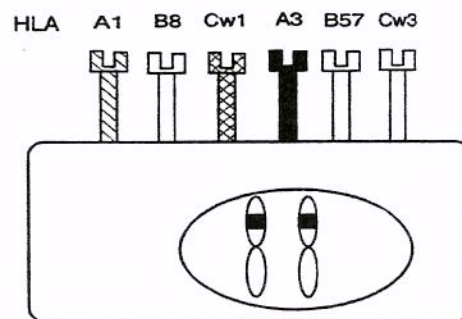


Figura 10: Expressão da co-dominância dos antígenos HLA

- O indivíduo pode ter dois alelos idênticos de um só gene (homozigose), ou pode ter dois diferentes alelo de um só gene (heterozigose).

- Os pais e filhos compartilham um cromossomo ou haplótipo (haploidêntico). Dois irmãos (irmão e irmã) têm 1 a 4 chances de receber as mesmas 4 cópias do cromossomo 6 de seus pais, e serão HLA idênticos. Assim, os genes de classe II são herdados em bloco. Tradicionalmente os cromossomos do pai são definidos como “a” e “b”, e os cromossomos da mãe são definidos como “c” e “d”.

Algumas vezes, as duas cópias do cromossomo 6 que carregam os alelos de classe II trocam segmentos gênicos; esse processo é denominado recombinação recíproca (Fig. 11). Dessa forma, as células germinativas podem herdar a nova combinação.

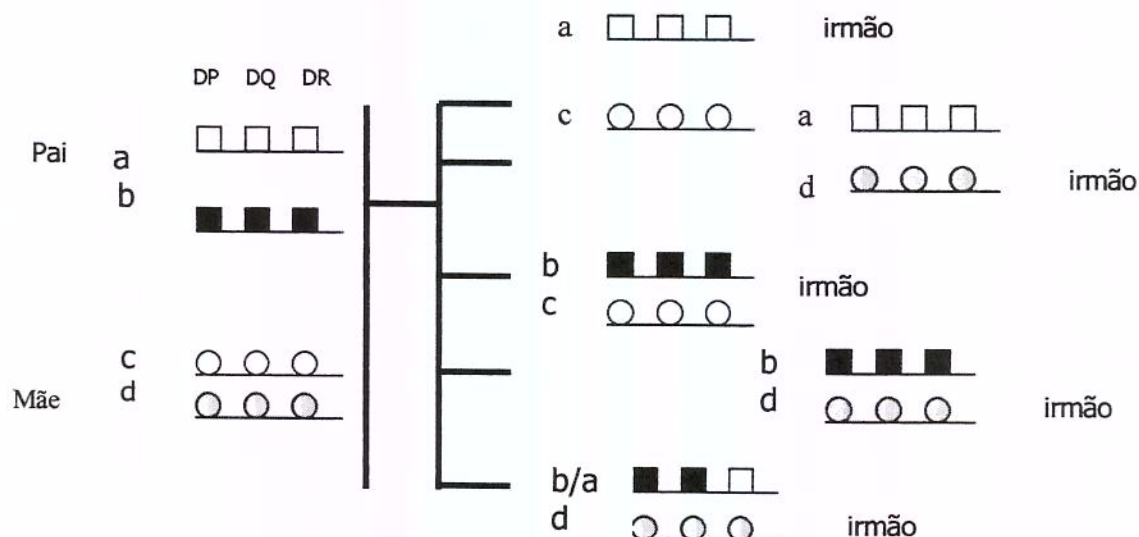


Figura 11: Representação da herança dos alelos HLA

1.3. HLA E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

Os estudos para correlacionar o polimorfismo HLA com a susceptibilidade e/ou resistência às doenças tiveram início com a padronização das técnicas sorológicas. Os avanços nessa área começaram com a demonstração em 1973 do antígeno HLA-B27 (então chamado HL-Aw27) (MARSH *et al.*, 2000a), apresentando uma frequência muito alta (95%), em pacientes com espondilite anquilosante (EA), em contraste à frequência de 2% na população em geral. Essas observações prontamente conduziram os pesquisadores a estudarem outras doenças, e numerosas associações foram encontradas. No entanto, o significado das associações foi muito variável e nenhuma foi tão forte como a primeira encontrada para o HLA-B27 e espondilite anquilosante (BENJAMIN & PARHAM, 1990).

Muitas doenças têm sido associadas ao Complexo HLA. No passado, foi questionado se esse fato era em razão, meramente, a dessa região do genoma haver sido mais estudada que as outras. No presente, tal hipótese mostrou-se incorreta, uma vez que extensivos estudos em outras regiões, envolvendo outros marcadores, falharam em demonstrar associações tão fortes quanto aquelas observadas em relação ao HLA. Os estudos do HLA e doenças tiveram início quando somente se tipificava os antígenos de

classe I, assim, todas as primeiras associações descobertas foram com antígenos HLA de classe I. Subseqüentemente, quando antígenos HLA de classe II foram definidos, muitas outras doenças apresentaram uma forte associação com antígenos de classe II, que estão em desequilíbrio de ligação com aqueles antígenos de classe I, previamente associados. Um exemplo clínico é o haplótipo HLA- A1, CW7, -B8, -DR3, -DQ2 e as doenças associadas a ele (MARSH *et al.*, 2000a).

Atualmente, para a grande maioria das doenças pesquisadas, as associações mais fortes ocorrem com o polimorfismo dos alelos HLA de classe II. Uma questão ainda não respondida, diz respeito ao envolvimento do polimorfismo HLA na causa da doença, no qual os alelos podem estar ligados à doença, ou meramente ligados a um outro gene com um polimorfismo ainda desconhecido. Muitas doenças associadas ao polimorfismo HLA não envolvem infecções agudas e seus sintomas são causados por um estado crônico de infecção ou auto-imunidade (TIWARI & TERASAKI, 1985; LECHLER, 1994). Entre elas podemos citar: espondilite anquilosante (AS), *diabetes mellitus* dependente de insulina (DM tipo I), artrite reumatóide (AR), miastenia grave (MG), lúpus eritematoso sistêmico (LES) e esclerose múltipla (EM). Nesses casos, acredita-se que os alelos HLA de classe I e II estejam diretamente envolvidos nos mecanismos causadores da doença. Entretanto, outros fatores genéticos devem ser considerados nas doenças associadas aos alelos HLA, uma vez que a grande maioria dos indivíduos portadores de um alelo ou haplótipo associado a uma doença, jamais desenvolveu a mesma. Como exemplo, foi verificado que somente 2% dos indivíduos que são HLA-B27 desenvolvem E.A., e o risco de incidência se encontra em 20% de pessoas positivas para o HLA-B27, com histórico de doença na família (BENJAMIN & PARHAM, 1990).

Em adição à predisposição genética, existem fatores ambientais que muitas vezes desempenham um papel importante, determinando o início e a manutenção da doença auto-imune associada ao HLA. A identificação desses fatores é um desafio, porque já foi amplamente constatado, que os sintomas da doença aparecem muito depois dos eventos que acionam o início da mesma. Entretanto, em quase todas as condições existem evidências circunstanciais de que a doença é iniciada por células T auto-imunes, as quais surgem como um produto da resposta imune à infecção. Assim, infecções pelo vírus Coxsackie, têm sido

correlacionadas com DM tipo I, e infecções bacterianas do intestino com doenças associadas ao HLA-B27 (SINHA *et al.*, 1990).

Em resumo, a visão corrente das doenças auto-imunes associadas ao HLA, é que o desenvolvimento da doença envolve a predisposição genética, resultante da combinação dos fatores para o HLA e demais genes. Mesmo entre os indivíduos que possuem uma predisposição genética, somente uma minoria desenvolve a doença. Para aqueles que a desenvolvem, a doença surge por mecanismos nos quais, um ou vários clones de células T, escapam da tolerância e se tornam reativos para peptídeos próprios. As células T atacam as células apresentadoras dos peptídeos próprios, ocorrendo a destruição celular e inflamação. Por outro lado, isso aumenta o processamento e a apresentação de proteínas próprias, as quais expandem as respostas imunes e, posteriormente, aumentam a destruição dos tecidos e a inflamação. Esses fatores conduzem a uma resposta inflamatória incontrolável nos tecidos alvos, desequilibrando suas funções fisiológicas (PIETERS, 1997).

1.4. A PATOGÊNESE DA PSORÍASE: ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A Psoríase é uma dermatose crônica, definida clinicamente como uma patologia que afeta a pele, unhas, mucosas, membranas, joelhos e cotovelos. É caracterizada por uma hiperproliferação de queratinócitos e pela presença de infiltrado mononuclear na derme e epiderme (BARKER, 1991; BARKER, 2001).

A causa é desconhecida, no entanto, mais recentemente vem sendo compreendida como uma doença mediada imunologicamente e, possivelmente, de natureza auto-imune (RIVITI & SAMPAIO, 2000; CHRISTOPHERS, 2001); considerada, também, uma patologia sócioeconômica importante e que afeta 2% da população caucasóide (PRINZ *et al.*, 1999). Ocorre da mesma forma, em ambos os sexos. Estudos populacionais mostram marcada agregação familiar, com 30% dos doentes referindo um parente afetado (RIVITI & SAMPAIO, 2000).

A predisposição genética parece ser um importante facilitador da expressão da doença e aproximadamente um terço dos pacientes afetados tem pelo menos um parente de primeiro grau portador da doença (ANDRESSEN & HENSELER, 1982).

Estudos histológicos de avaliação das manchas da Psoríase revelam dois fatores proeminentes: a) hiperplasia da epiderme e b) infiltrado inflamatório. As manchas em forma de placa na pele consistem de hiperplasia, microabcessos e diferenciação incompleta de queratinócitos; todos esses fatores contribuindo para formação de placas escamosas elevadas. O infiltrado inflamatório na derme e intraderme é composto na grande maioria por células T (FERENCZI *et al.*, 2000).

A Psoríase pode ser classificada em 5 grandes grupos:

(RIVITI & SAMPAIO, 2000; CHRISTOPHERS, 2001).

1. Psoríase em placas (ou Psoríase Vulgar)

É a forma mais comum, observada em quase 90% dos doentes. Manifesta-se por placas eritemato-escamosas bem delimitadas, de tamanhos variados, afetando, geralmente, de forma simétrica a face de extensão dos membros, particularmente joelhos e cotovelos, couro cabeludo e região sacra. O número das lesões é muito variável, de uma a centenas, sendo que qualquer área da pele pode estar acometida. Com menor frequência, pode atingir as dobras flexurais- Psoríase Invertida – quando a descamação se torna menos evidente pela sudorese e maceração locais. Eventualmente, são afetadas as mucosas genitais ou mucosas dos lábios.

Nas lesões de Psoríase, às vezes predomina o eritema, às vezes predomina a descamação, formada por escamas secas, branco-prateadas, aderentes e estratificadas. Há, no entanto, sempre uma uniformidade no aspecto clínico das lesões.

Há, frequentemente, comprometimento das unhas, que apresentam pequenas depressões (unha em dedal). Onicólise e hiperqueratose sub-ungueal são também observadas.

Eventualmente, ocorrem sintomas subjetivos como prurido e queimação que, de acordo com o estado emocional do doente, atingem intensidade variável.

A evolução é crônica, com períodos de exacerbação e de acalmia, quando podem ser observadas lesões anulares, características do quadro em remissão.

A curetagem metódica de Brocq, que consiste no raspado das lesões com cureta, fornece dois importantes sinais clínicos:

a) Sinal de Vela- quando, pela curetagem, destacam-se escamas semelhantes às encontradas na raspagem de uma vela.

b) Sinal do Orvalho Sangrento ou de Auspitz- quando, pela continuação da raspagem, após a retirada das escamas, encontra-se superfície vermelho brilhante com pontos hemorrágicos.

2. Psoríase em gotas

Mais comum em crianças, adolescentes e adultos jovens, manifesta-se pelo aparecimento súbito de pequenas pápulas eritemato- descamativas de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro, geralmente localizadas no tronco. Como característica, a *Psoríase Gutata* é precedida por uma infecção estreptocócica, comumente de vias aéreas superiores, e costuma resolver-se espontaneamente, após 2 a 3 meses. Às vezes, as lesões podem persistir, aumentar de tamanho, tomando as características da psoríase em placas.

1. Psoríase eritrodérmica

É caracterizada por eritema intenso, de caráter universal, acompanhado de descamação discreta. A eritrodermia pode ocorrer no curso evolutivo da doença. Mais freqüentemente, é desencadeada por terapias intempestivas, por administração e posterior interrupção de corticóide sistêmico, podendo corresponder à exacerbação da doença em doente com AIDS.

Na Psoríase eritrodérmica, a atividade do processo psoriático é intensa, com proliferação aumentada e perda da maturação das células epidérmicas, levando à produção de queratinas anormais. Dessa forma, a descamação é discreta e predomina o eritema. Pela vasodilatação generalizada, há perda excessiva de calor levando à hipotermia. Nos casos de longa evolução, podem ocorrer diminuição do débito cardíaco e até mesmo comprometimento da função hepática e renal.

4. Psoríase pustulosa

É um quadro de lesões eritemato - escamosas e pustulosas generalizadas, conhecida com a denominação de Psoríase de Von Zumbusch. Pode ser desencadeada num doente com Psoríase Vulgar, por interrupção de corticóides sistêmicos, por hipocalcemia, por infecções ou mesmo por irritantes locais. Geralmente há comprometimento do estado geral, febre e leucocitose. A erupção persiste por poucas semanas, revertendo ao quadro anterior ou se transformando em psoríase eritrodérmica.

5. Psoríase artropática

Ocorre em 5 a 7 % dos doentes de Psoríase, em geral naqueles com lesões cutâneas disseminadas. A forma mais freqüente é uma mono ou oligoartrite assimétrica de fácil controle e bom prognóstico, que afeta particularmente as articulações interfalangeanas distais ou proximais. A velocidade de hemossedimentação está aumentada; porém o fator reumatóide e os fatores antinucleares estão ausentes.

1.4.1. Hipóteses na patogênese da psoríase

Os primeiros estudos relacionados à psoríase tiveram início em meados do século XIX; a doença era descrita tanto como um processo de crescimento e regulação anormal dos queratinócitos, como um processo de ordem inflamatória (RADCLIFFE-CROCKER, 1883). A partir dos anos 70 com a imunologia celular apresentando grande desenvolvimento, a doença foi fortemente associada às células brancas do sangue (VALDIMARSSON *et al.*, 1986).

Investigações posteriores enfatizaram a presença e a importância funcional das células T nas lesões psoriáticas (CHANG *et al.*, 1994). As hipóteses atuais da mediação imune evidenciam um papel central das células T, envolvendo um infiltrado inflamatório celular na derme e epiderme da psoríase, consistido predominantemente de células T (BJERKE, KROUGH, MATRE, 1978; BOS & DE RIE, 1999). Evidências para essas hipóteses provêm conjuntamente, de pesquisas clínicas e de laboratório, e nas ferramentas de investigações, utilizando imunossuppressores, tais como a ciclosporina (DEMIDEM *et al.*, 1991). E as evidências mais fortes, apontam para a interação dos seguintes componentes: as células T, o perfil das citocinas, a apresentação do antígeno, os superantígenos, as células brancas da epiderme e as associações nos genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MOSSMAN *et al.*, 1986).

A despeito da Psoríase ser definida, clinicamente, como uma doença comum da pele, existe uma série de questões ainda não entendidas; uma delas é sobre a prevalência da doença. Nesse ponto, existem falhas nos dados específicos, e a maioria dos trabalhos realizados em diferentes populações humanas relata apenas estimativas (LOMHOLT, 1963). Os estudos fundamentados em população são raros, e observações longitudinais nas mudanças dos valores sobre a frequência, incidência, etc, são falhos (CHRISTOPHERS, 2001).

Os levantamentos epidemiológicos existentes relacionam um grupo distinto de doenças muito frequentemente associadas à psoríase, tais como, artrites, colites, diabetes e hipertensão; em contraste, dermatite atópica e alergia são menos frequentemente associadas. Essas associações foram determinadas pela comparação das frequências de ocorrência da doença e dos padrões de resposta imune relacionadas às células Th-1 ativadas, na psoríase e na dermatite atópica, as quais parecem ser mutuamente exclusivas, em razão a dicotomia Th-1/ Th-2 (SAED *et al.*, 1994).

O provável papel da auto-imunidade na Psoríase é um conceito em desenvolvimento, e necessita de novos esclarecimentos (BOS & DE RIE, 1999); muitos trabalhos defendem a idéia da ativação das células T no início da doença e a continuidade do processo pela proliferação dos queratinócitos da epiderme, (STRANGE, COOPER,

HANSEN, 1993). O início da doença pode ser relacionado à ativação das células TCD4+, e sua manutenção na continuidade dessa ativação pelas células TCD8+, propiciando a ligação da associação MHC classe I e classe II (GOTTLIE & KRUEGER, 1994). A combinação exata de citocinas ou fatores de crescimento na subsequente ativação da célula T e proliferação dos queratinócitos ainda é incerta, porém evidências consistentes apontam para o perfil Th1, no qual o γ -interferon é um componente vital (HANCOCK, KAPLAN, COHN, 1988).

1.4.2. Interações das células T e queratinócitos

O conceito da pele, relacionado à atuação mais periférica do sistema imune, tem evoluído consideravelmente na última década. Desse modo, de uma função vista, puramente, como barreira imunológica, hoje é amplamente constatado que a pele contém todos os elementos de um intrincado sistema imune, compreendendo: linfócitos e células de Langerhans CD1+, DR+, as quais circulam entre a epiderme e os linfonodos locais; células apresentadoras de antígenos da derme, células dendríticas da derme e queratinócitos, os quais produzem uma grande quantidade de citocinas imunorregulatórias (CERIO *et al.*, 1989).

Os queratinócitos da epiderme liberam, (particularmente quando danificados) IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fatores estimuladores de colônia (G-CSF, M-CSF, GM-CSF) IL-3, fatores de crescimento, incluindo fatores de TGF α e β , fatores de crescimento derivados de plaquetas e fatores de crescimento de fibroblastos, bem como hormônio estimulante de α melanona, e inibidor específico de IL-1, (IL-1Ra), IL-2R (KRISTENSEN *et al.*, 1992; HAMMERBERG, AREND, FISCHER, 1992). Em geral, IL-1, IL-6, IL-7, IL-8 e TNF- α possuem propriedades inflamatórias, enquanto IL-10, TGF- β , α -MSH e IL-2R tem ação anti-inflamatória nas inflamações cutâneas (BOS & DE RIE, 1999).

Mais recentemente, tem sido descrita a importância do tecido vascular na superfície da pele, no perfeito funcionamento do sistema imune, e conseqüentemente na interação entre locais definidos na molécula de adesão nos leucócitos, e nas células endoteliais da derme; como exemplo são as moléculas I de adesão intercelular (ICA M-1), e moléculas I de adesão das células vasculares (VCA M-1), ambas são críticas para o recrutamento de células inflamatórias na pele (BARKER, 1991).

Os mecanismos antígenos-dependentes de amplificação e persistência da inflamação envolvem as células T- Langerhans' ou interações dos macrófagos com células da derme que podem dar continuidade ao processo (BAADSGAARD *et al.*, 1989).

A expressão nos queratinócitos de ICAM-1, induzido pelo interferon-gama (IFN- γ), produzido pelas células T infiltrantes, pode ser importante em determinar a exocitose dos leucócitos na epiderme, observado em muitas dermatoses inflamatórias (NICKOLOFF & GRIFFITHS, 1989).

Tem sido proposto que na Psoríase ocorre uma estimulação persistente das células T, ou da apresentação de antígenos estranhos (ex. micróbios) pela células apresentadoras de antígenos ou de uma auto-reatividade (VALDIMARSSOM *et al.*, 1986). Foi constatado que o infiltrado, presente na derme de pacientes com lesões psoriáticas, contém muitos linfócitos T "helper" antígeno-reativos (MORGANROTH, 1991).

Existe um grande aumento no número e na função de células apresentadoras de antígenos, capazes de ativar células T autólogas, nas lesões da pele, resultando em ativação inadequada das células T na epiderme, em razão do funcionamento anormal das células de Langerhans (STREILEIN, 1990). A esse respeito é interessante lembrar que 20% das células T da epiderme nas lesões psoriáticas, expressam marcadores de ativação, comparados com somente 5% das células T da derme, sugerindo que o acesso à epiderme está associado com a ativação (NICKOLOFF, TURKA, MITRA, 1995).

Por outro lado, linhagens de células de lesões da pele psoriática demonstram auto-reatividade diretamente contra antígenos específicos dos locos secundários de histocompatibilidade (NIKAEIN *et al.*, 1991).

As citocinas liberadas por queratinócitos ativados ou leucócitos ativados, desempenham um papel importante na imunopatogênese da psoríase. Tem sido proposto que queratinócitos que vivem próximos às células endoteliais podem orquestrar eventos inflamatórios na derme com psoríase, pela secreção de citocinas inflamatórias, com efeitos na vascularização, tais como IL-1, ou TNF- α , ou com propriedades quimiotáticas, como IL-8 (NICKOLOFF, KARABIN, BARKER, 1991).

1.4.3. Superantígenos

O sinal precipitador de ativação nas placas da psoríase é desconhecido, mas os candidatos a esse sinal são os superantígenos, alguns agentes infecciosos ou talvez epítomos ocultos da pele, revelados somente após a exposição a tais antígenos (VALDIMARSSON *et al.*, 1995).

Os superantígenos têm a capacidade de serem apresentados diretamente às células T pelas células apresentadoras de antígenos sem recorrer ao processamento intracelular ou de apresentação, dentro de peptídeos, de ligação da célula apresentadora de antígeno (DRAKE & KOTZIN, 1992). A sequência de homologia entre a proteína do estreptococo M6 e a ceratina 50 Kda tipo I implica que a proliferação clonal da célula T, diretamente contra o estreptococo, possa reagir cruzadamente e descobrir o epítipo da ceratina. Na verdade, foi demonstrada reatividade cruzada entre a ceratina da epiderme e o estreptococo (SWERLICK, CUNNINGHAM, HALL, 1986).

Os superantígenos, incluindo o estreptococo, são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos para os distintos receptores V β do receptor de célula T, e esse processo conduz a uma expansão local e clonal das células T, expressando as apropriadas regiões V β . A constatação que células T expressam regiões V β , nas placas da pele, leva a supor o conceito de condução do superantígeno na psoríase (LEUNG *et al.*, 1993; CHANG *et al.*, 1994).

Experimentos, utilizando a técnica de PCR, não foram capazes de identificar as células T expressando receptores V β nas lesões crônicas e nas placas de psoríase. Talvez o superantígeno, se importante nesse conceito, seja somente responsável para dar início às lesões na psoríase, mas não para a sua continuidade, a qual pode ser mediada pelos antígenos próprios (LEWIS, BARKER, BOKTH, 1993).

1.4.4. Aspectos genéticos e imunogenéticos

A psoríase é entendida como uma doença multigênica e cuja expressão, em parte, depende de fatores externos (ELDER, NOIR, VORHEES, 1994). No decorrer dos últimos anos, dados confirmatórios consistentes apontam para uma bagagem genética por meio de estudos de epidemiologia e, mais importante, pelos estudos dos genes envolvidos na patologia (BRANDRUP *et al.*, 1982; HENSELER, 1997).

Os estudos em famílias e a experiência clínica, provenientes de dados epidemiológicos, mostram que a psoríase é uma doença genética (BRANDRUP *et al.*, 1982). O modo de herança ainda não está bem estabelecido, sendo provável que seja poligênica ou autossômica dominante e de penetração incompleta. Gêmeos homozigotos e dizigotos apresentam aproximadamente 70% a 20% de concordância, respectivamente, para Psoríase (FARBER, NALL, WATSON, 1974; LOMHOLT *et al.*, 1963). E o fator indicador na concordância menor que 100%, para psoríase observada em gêmeos homozigotos, implica necessariamente na participação dos fatores ambientais para o completo estabelecimento clínico da doença (ELDER *et al.*, 1994).

As associações genéticas, geralmente identificadas na psoríase, estão nos alelos do complexo principal de histocompatibilidade, particularmente nos antígenos: HLA-Cw6 e HLA-DR7, e nos haplótipos: HLA-A2, HLA-B13, HLA-Cw6, HLA-DR7 e HLA-DQA1*0201, HLA-A1, HLA-B7, HLA-Cw6, HLA-DR7, DQA1*0201. As associações mais fortes têm sido descritas com o antígeno HLA-Cw6 e observadas em diferentes populações da Europa, Japão e Israel (SCHMIDT-EGENOLF *et al.*, 1993), e na população de Campinas, Sudeste do Brasil (THOMAZ *et al.*, 1998).

O aparecimento precoce da doença, denominada de Psoríase tipo I, ocorrendo pela primeira vez em indivíduos com menos de 40 anos de idade, é usualmente associado com história familiar e com genes HLA de classe I, particularmente o HLA-Cw6, numa frequência de até 85% (JENISCH, HENSELER, WESTPHAL, 1995). O aparecimento tardio (tipo II), por volta dos 60 anos de idade, não mostra associações com os alelos HLA (HENSELER & CHRISTOPHERS, 1990; CHRISTOPHERS & HENSELER, 1992). Posteriormente, a psoríase com início em idade jovem foi associada aos antígenos HLA de classe I – HLA-B13, -Bw57, -Cw6 e -DR7. Por outro lado, o surgimento da doença em idade mais avançada, foi associado aos alelos HLA-A2 e HLA-B27. A mais forte associação foi observada na Psoríase tipo I, para o alelo HLA- Cw6, presente em 80-85% dos pacientes caucasianos (HENSELER & CHRISTOPHERS, 1995). Em pacientes japoneses foi observada, associação com o alelo HLA-Cw7 em apenas 20% (OZAWA, OHKIDO, INOKO, 1988). Estudos subseqüentes por determinação molecular, mostraram os haplótipos HLA-DRB1*0701/02-DQA1*0201 e DQB1*0303 sempre em adição ao HLA-Cw6, fortemente associados à Psoríase (SCHMIDT-EGENOLF *et al.*,1993).

Nos alelos de classe I- HLA-Cw6, juntamente com HLA-Cw4 e HLA-Cw7, foi constatada a substituição do aminoácido alanina pela tirosina na posição 73, na fenda de ligação com o antígeno da molécula HLA-C (HENSELER & CHRISTOPHERS, 1995). Essa observação sugere que na fenda da molécula HLA-C, o local de encaixe do antígeno de ligação é importante para a apresentação do suposto antígeno associado à psoríase (IKÄHEIMO *et al.*,1994).

A associação dos antígenos HLA-DQ9 e HLA-Cw6 é altamente preditiva para a susceptibilidade à Psoríase em praticamente todas as populações estudadas (JENISCH *et al.*,1995); muito embora o antígeno HLA-DQ9, sozinho, não seja um marcador de predisposição à doença.

Do ponto de vista imunológico, uma anormalidade em nível da molécula de classe I- HLA-Cw6 pode resultar no seu reconhecimento para antígenos estranhos, envolvendo a restrição das moléculas de classe I para as células T-CD8. Alternativamente, ela pode conduzir as ligações preferenciais de antígenos heterólogos (micróbios), e

antígenos autólogos, ou ambos, com o subsequente reconhecimento pelas células T-CD8 (GRIFFITHS, GRIFFITHS, VOORHEES, 1995). As células se expandindo passam a responder aos peptídeos autólogos, resultando em uma doença auto-imune (NICKOLOFF *et al.*,1995).

Entretanto, as moléculas de MHC de classe I são expressas na membrana de quase todas as células nucleadas do corpo, exceto nas vilosidades trofoblásticas, nos neurônios do sistema nervoso central, no endotélio córneo, e na porção exócrina do pâncreas (LECHLER, 1994). O fenômeno de restrição pelas moléculas de classe I para os queratinócitos e sinóvia sugerem o envolvimento de peptídeos locais, antígenos ou superantígenos (VALDIMARSSON *et al.*,1995). Também, a ativação de células T com restrição MHC-classe I pode resultar em danos na expressão da célula MHC de classe I, como nos queratinócitos (VALDIMARSSON *et al.*,1986).

Alternativamente, a associação das moléculas HLA na psoríase pode ser indireta, e resultar de um desequilíbrio de ligação com um possível gene, em outro lugar do cromossomo 6 (TREMBATH, CLOUGH, ROSBOTHAM, 1997). Na região HLA, na região específica 21.3 6p, muitos genes estão localizados e para os quais os produtos também sugerem um envolvimento com a patogênese da psoríase, incluindo os componentes do complemento, fator de necrose tumoral α (TNF - α) e β , e genes envolvidos na apresentação do antígeno, tais como transportadores de peptídeos e proteosomos (BALENDRAN, CLOUGH, ARGUELLO, 1999).

A esse respeito foi encontrado que o polimorfismo no gene promotor do TNF- α (TNF-238.2) está associado com um risco relativo alto para desenvolver psoríase juvenil e artrite psoriática (BOS & DE RIE, 1999).

Um outro gene associado com a Psoríase foi determinado no final do braço curto do cromossomo 17q (TOMFOHRDE *et al.*,1994). Essas associações foram descritas em três gerações, de oito grandes famílias testadas e foi sugerido que, na mesma região do cromossomo 17q, encontra-se presente um gene de ativação da célula T. Esse gene codifica o promotor do gene da interleucina IL-2 (LEE *et al.*,1988).

Recentemente, foram descritos quatro genes ligados à regeneração e hiperplasia dos queratinócitos (BURDEN, JAVED, HODGINS, 1996), e a expressão desses genes relaciona-se ao controle de queratinócitos na psoríase (NAIR *et al.*, 1997).



2. OBJETIVOS

- a) Caracterizar em nível molecular, amostras de indivíduos controle saudáveis da população de Campinas e de pacientes com Psoríase Vulgar, da mesma região geográfica, para determinar os alelos de classe II, HLA-DRB1 – B5 e DQB1, bem como suas frequências alélicas e gênicas;
- b) Comparar as frequências dos alelos e haplótipos HLA de classe II, das duas populações estudadas e estabelecer a significância estatística com a susceptibilidade e/ou proteção dentro da doença estudada;
- c) Correlacionar as frequências dos alelos e haplótipos de classe II nos pacientes, com a idade de início da doença.



3. MATERIAL E MÉTODOS

LISTA DE REAGENTES

1. Tampão de Lise I

0,3M sacarose (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

5mM MgCl₂ (Cloreto de Magnésio) (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

10mM Tris-HCl (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

Triton X-100 U.S.P. 1% (Nuclear)

Volume final = 1 litro, estocada em local escuro, a 4°C.

2. Tampão de lise II

0,024M Na-EDTA (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

0,075M NaCl (Synth – Labsynth Produtos para laboratórios LTDA, Diadema-SP – Brasil).

O pH era ajustado a 8,0 com NaOH (hidróxido de sódio – Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – Brasil), volume final = 1 litro, e estocada à temperatura ambiente, (22 – 25°C).

3. Solução Tris-Borato – 10X- Tampão de Eletroforese

0,9M Tris-Base (Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – R.J.- Brasil).

0,9M ácido bórico (Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – R.J.- Brasil).

0,2M Na-EDTA pH=7,5 (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA)

Volume final = 1 litro.

A solução era estocada à temperatura ambiente, (22-25°C).

4. Álcool isopropílico (C₃H₈O)- (Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – R.J.- Brasil).

5. Álcool etílico (C_2H_6O) - 70% - 73,6mL de álcool etílico (Merck S.A. Ind. Químicas – Rio de Janeiro – R.J.- Brasil) diluídos em 26,3mL de água bidestilada ultrapura. A solução era estocada à temperatura ambiente, (22-25°C).

6. Cloreto de Sódio (NaCl)- 6,0M – solução saturada – 35,04g NaCl (Synth – Labsynth Produtos para laboratórios LTDA, Diadema- SP – Brasil), eram diluídos em 100mL de água bidestilada ultrapura , em seguida a solução era autoclavada à 121°C.

Era estocada à temperatura ambiente, (22-25°C).

7. Perclorato de Sódio – 0,5M – 70,2g de Perclorato de Sódio monohidratado (SIGMA Chemical CO St.Louis, MO USA), eram diluídos em 100mL de água bidestilada ultrapura e estocado à temperatura ambiente, (22-25°C).

8. SDS – Dodecil Sulfato de Sódio - 10,0g de SDS (SIGMA Chemical CO

St.Louis, MO USA), eram diluídos em 100mL de água bidestilada , ultrapura.

3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DA PESQUISA

3.1.1. Seleção dos indivíduos controle

Foram selecionados e estudados 100 indivíduos sadios, doadores do Banco de Sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas- Hemocentro, provenientes da região de Campinas- SP. A análise do grupo étnico foi feita sempre por um mesmo examinador. Foram incluídos na amostra indivíduos classificados como brancos, formadores da atual população brasileira. Foram excluídos da amostra os indivíduos do grupo étnico negro. A amostra foi constituída de 65 do sexo masculino (média= 36,8 anos) e 35 do sexo feminino (média= 37,4 anos), com idades variando entre 19 e 63 anos (média= 37,0 anos) (tabela I-apêndice).

Foram colhidas amostras de sangue, com consentimento pós-informação dos 100 doadores saudáveis, e colhidos 10mL de sangue venoso em tubos estéreis, “vacutainer”, contendo EDTA (Sal dissódico do ácido etileno-dinitrilotetracético-di-hidrato) como anticoagulante. O material foi encaminhado ao laboratório de Imunogenética de Transplantes, da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, e da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, onde foi processado para os procedimentos de tipificação dos alelos de histocompatibilidade estudados.

Participaram do estudo, somente os indivíduos provenientes da mesma área geográfica que os pacientes. Todos os doadores foram submetidos a exame médico em que não se constatou nenhuma doença de base e apresentaram sorologia negativa para doença de Chagas, Hepatite B e C e HIV.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

3.1.2. Seleção dos Pacientes

Foram selecionados e avaliados um total de 60 pacientes com diagnóstico de Psoríase vulgar, com tempo de diagnóstico da doença entre 2 e 79 anos (média=15,8). Todos os pacientes eram oriundos do Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da - Unicamp, sendo 32 do sexo masculino (média= 51,5 anos), e 28 do sexo feminino (média= 52,5 anos), com idade variando entre 17 e 84 anos (média=52 anos) (tabela II- Apêndice). Em relação as etnias foram observadas as mesmas características definidas para o grupo de indivíduos-controle sadios e igualmente, foi excluído desse estudo os indivíduos do grupo étnico negro.

O diagnóstico da Psoríase Vulgar foi estabelecido segundo os seguintes critérios clínicos:

- a) aspecto da lesão dermatológica, (sinal do espermacete positivo e sinal de Auspitz positivo à curetagem metódica de Brocq) .

- b) presença de uma a centenas de lesões em forma de placas eritemato-escamosas de tamanhos variados e bem definidos
- c) localização das lesões, (membros, particularmente joelhos e cotovelos, couro cabeludo e região sacra, mucosas genitais e mucosas dos lábios).

3.2. TIPIFICAÇÃO DOS GENES HLA DE CLASSE II

3.2.1. Extração e purificação do DNA

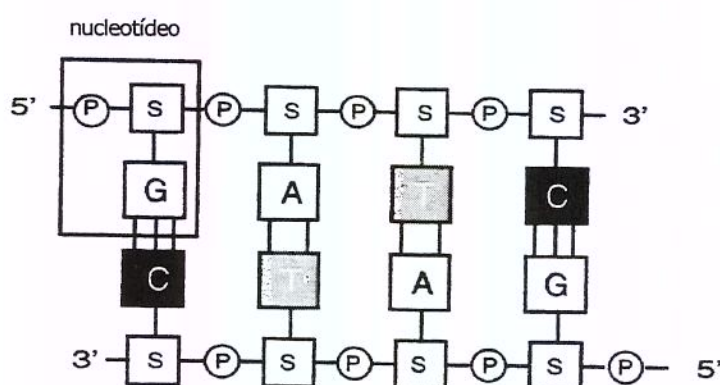


Figura 12: Estrutura do DNA

O DNA (fig. 12) foi extraído por um procedimento denominado “salting out”, a partir de células do sangue periférico (MILLER *et al.*, 1988). Foram coletados 10mL de sangue venoso, utilizando EDTA (Sal dissódico do ácido etileno-dinitrilotetraacético- di-hidrato) como anticoagulante. Não se utilizou sangue heparinizado, pois a heparina pode interferir na amplificação do DNA pela enzima Taq polimerase. O sangue total foi transferido para um tubo cônico de polipropileno de 50mL, no qual foi adicionado 40mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos (tampão de Lise I) gelado, composto pelos seguintes reagentes: sacarose 0,3M, triz-HCl 10mM, $MgCl_2$ 5mM e triton X100 a 10%. Em seguida, a solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada durante 5 minutos a $2400 \times g$, a $4^\circ C$. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado ressuscitado em 4,5mL do tampão de lise de glóbulos brancos (tampão de lise II), composto pelos seguintes reagentes: NaCl 0,075M, NaEDTA 0,024M, hidróxido de sódio 6,0M (NaOH), adicionado

de 125µl de Dodecil Sulfato de Sódio SDS 10%, e 1,1mL de perclorato de sódio 5M, agitado vigorosamente por 10 segundos à temperatura ambiente. Para a extração de proteínas foi adicionado 2mL de NaCl 6M, seguido de agitação vigorosa durante 15 segundos, à temperatura ambiente. Após uma segunda centrifugação a 1500 x g, por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL, evitando-se a contaminação com o precipitado, e foi adicionado 7mL de isopropanol absoluto, misturado gentilmente para a precipitação e ressuspensão do DNA. O DNA precipitado foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur selada e após a retirada do excesso de isopropanol foi lavado três vezes em 3mL de álcool etanol a 70%, por 1 minuto, à temperatura ambiente e redissolvido em 300 a 500µl de água deionizada estéril. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro, em 260nm e 280nm (UV) e o grau de pureza do DNA extraído foi calculado pela razão entre absorbância obtida em 260nm e 280nm (A260:A280). Esta razão foi considerada adequada, quando permanecia entre 1,6 a 2,0. Quando os valores da absorbância eram inferiores a 1,5, o DNA era precipitado com álcool isopropílico. Finalmente, a concentração do DNA foi ajustada para 100ng/µl, com água deionizada estéril. Posteriormente, foi realizada a amplificação do DNA, e a amostra concentrada guardada em freezer a -20°C. Caso este passo fosse realizado posteriormente, o DNA era requantificado no momento da reação, devido a sua precipitação (HURLEY, 1997).

3.2.2. Amplificação do gene, utilizando a reação de polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR)

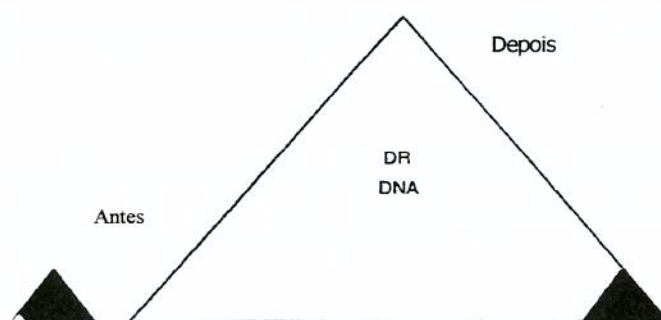


Figura 13: Amplificação por PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método sensível que pode ser utilizado para gerar milhões de cópias de um gene específico HLA (HURLEY, 1997).

O DNA foi amplificado pela reação de polimerase em cadeia, com um conjunto de “primers” sequência específica, segundo a metodologia desenvolvida por ZETTERQUIST & OLERUP, 1992, utilizando-se “primers” sintetizados, fornecidos pela One Lambda, Inc – Ca EUA, tanto em nível I– genérico, como em nível II, específico.

A reação de amplificação em nível I (genérico) foi realizada em microplacas (One Lambda – Inc. Ca- EUA), com 32 poços contendo os “primers” já padronizados. Os demais reagentes da reação de amplificação foram misturados um tubo (mix) – as bases nitrogenadas, $MgCl_2$, corante, e $2\mu l$ da enzima Taq polimerase-($5U/\mu l$)-(Gibco – Brasil). Inicialmente, eram retirados $9\mu l$ da solução (mix) e adicionados na escavação do controle negativo, previamente preparada com $1\mu l$ de água deionizada estéril; a seguir era adicionado ao restante da solução (mix) $39\mu l$ de DNA. E por fim, era colocado $10\mu l$ da solução (mix) em cada um dos poços da placa, exceto no controle negativo.

Pelo método PCR/SSP, foram realizadas as identificações, em nível genérico, do alelo HLA-DRB, através de 21 reações para as especificidades HLA – DRB1, 3 reações para as especificidades HLA – DRB3, 1 reação para o alelo DRB4 , 2 reações para o alelo DRB5, e 7 reações para as especificidades HLA – DQB1.

A reação de amplificação em nível II (específico) foi realizada da mesma maneira da reação de amplificação em nível I, mas com algumas modificações, que foram: as microplacas (One Lambda Inc. – Ca-EUA), apresentavam 96 poços; a quantidade de taq polimerase era $5,6\mu l(5U/\mu l)$ - (Gibco- Brasil), e o volume de DNA usado era $111\mu l$.

Pelo método PCR-SSP em nível II, ou alta resolução, foi possível identificar 221 alelos HLA-DRB1.

Para a amplificação do DNA, a microplaca foi colocada em um termociclador (MJ-PTC-100, Watertown, MA- USA), para um ciclo no qual ocorria os seguintes passos:

A- Desnaturação do DNA - 94°C – (Fig. 14) - responsável para que ocorra a desnaturação do DNA, separando a dupla fita.

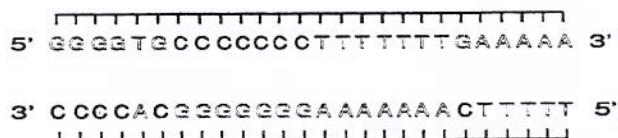


Figura 14: Desnaturação

B- Anelamento dos “primers” - 55 a 59°C-(Fig. 15) - responsável para que os “primers” se anelem na região específica no DNA, delimitando o fragmento da região específica no DNA.



Figura 15: Anelamento dos primers

C- Extensão 72°C- (Fig. 16) - responsável para que ocorra a síntese do DNA e a enzima Taq polimerase adicione os nucleotídeos com suas bases complementares, entre os “primers” que delimitam o início e o final do fragmento.

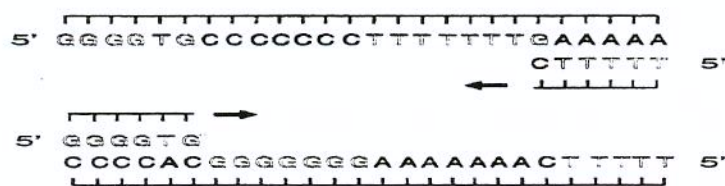


Figura 16: Extensão

A amplificação foi realizada através de 30 ciclos conforme esquema abaixo:

Temperatura	Tempo	Função
1- 94°C	2 min 10 seg	Desnaturação
2- 59°C	1 min	Anelamento
3- 94°C	10 seg	Desnaturação
4- 59°C	1 min	Anelamento
5- 8 vezes o passo 3 e 4		
6- 94°C	10 seg	Desnaturação
7- 55°C	50 seg	Anelamento
8- 72°C	30 seg	Extensão
9 –19 vezes o passo 6 até o 8.		
10 4°C	24 horas	Refrigeração

No final dos ciclos, os “primers” estavam prontos para serem aplicados ao gel de agarose a 2%, com a adição do brometo de etídio a 0,5%, para tipificação dos alelos DRB1-alta e média resolução e DRB3,-B4,-B5, somente em média resolução.

3.3. ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO

Para determinar se o DNA foi bem amplificado após a reação de PCR, os produtos de amplificação da reação de polimerase em cadeia, foram separados por eletroforese em gel. A preparação do gel foi realizada, utilizando-se agarose a 2% em tampão Tris-Borato (Triz-Base- 0,9M, ácido bórico – 0,9M, e Na-EDTA – 0,2M, pH=7,5). A agarose foi dissolvida à alta temperatura, entre 90°C e 95°C, em um aparelho de microondas por 2 a 3 minutos, resfriado até 60°C com posterior adição de brometo de etídio a 0,5%, misturada e despejada na placa com pentes, para a formação de poços, e deixada em repouso por 40 a 50 minutos, à temperatura ambiente. Após a retirada dos pentes, o gel foi colocado na cuba de eletroforese (Fharmacia-GNA – Suécia), com o nível da solução

tampão (Triz-Borato-1X) de 2 a 3mm acima da superfície do gel. Foram então aplicados os produtos de amplificação padronizados e o controle negativo. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 220V. Após esse período, o gel foi colocado em um transluminador UV (312nm) e fotografado para documentação e interpretação.

3.3.1. Fotodocumentação e interpretação dos resultados da tipificação por DNA

Muitos alelos HLA não apresentavam uma sequência única de nucleotídeos que caracterizava o alelo específico (Fig. 17). Um erro nas condições ideais de amplificação poderia resultar em alelos falsos positivos (falsos alelos amplificados) ou falsos negativos (alelos corretos não amplificados).

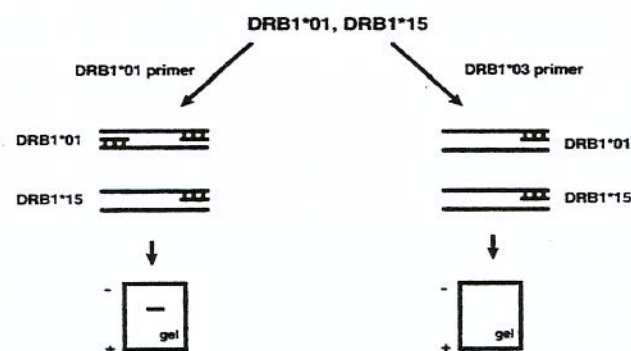


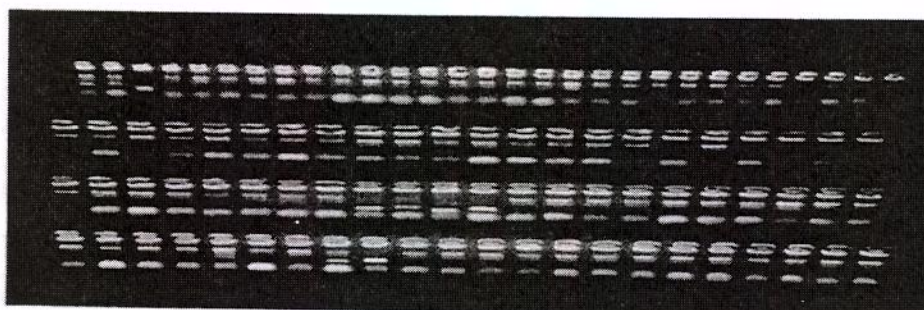
Figura 17: Representação de primer específico

A interpretação era baseada na presença ou ausência de amplificação do próprio alelo ou grupo específico; cada uma das misturas de iniciadores específicos continha também um par de iniciadores não alélicos que amplificava o gene da β globina humana, servindo como controle positivo de amplificação. Esse conjunto de “primers” não alélicos era 5 vezes menos concentrado que os “primers” específicos, produzindo um produto de amplificação de 750 pares de bases, sendo visualizadas quando a amplificação grupo- específico não ocorria. A presença de amplificação grupo – específico era visualizada no gel pela formação de um produto de cerca de 125 a 250 pares de bases. No poço referente ao controle negativo nenhum desses fragmentos era observado.

Fotodocumentação – Tipificação dos gens HLA de classe II, HLA- DRB1, por alta resolução ou específico PCR/SSP- Paciente com Psoríase Vulgar .

DRB1* 0102 DRB1*1301

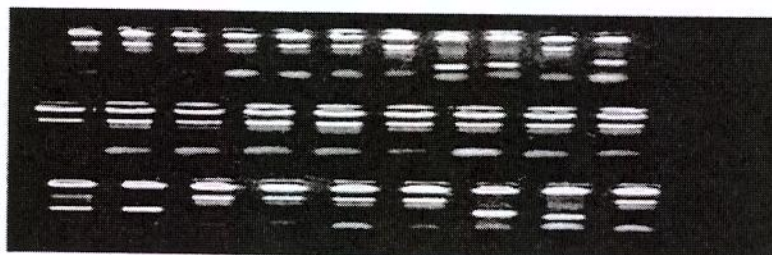
DRB3*01



Fotodocumentação – Tipificação dos gens HLA de classe II HLA-DRB1 e HLA-DQB1- genérico ou baixa resolução, PCR/SSP , Paciente com Psoríase Vulgar.

DRB1*04 DRB1*11

DRB3*02 DRB4*01



3.3.2. Associação e definição dos alelos HLA de tipificação por DNA

As tipagens HLA eram determinadas pela comparação dos primers positivos e negativos, utilizando a lista de alelos conhecidos. Os resultados de fotodocumentação eram inseridos em uma planilha, fornecida pela One Lambda – Inc – Ca – EUA, onde estavam definidas as mesmas especificidades contendo “primers”. Através de programa de computador, Software, também fornecido pela One Lambda – Inc -Ca -EUA, era possível realizar a interpretação, a fim de definir com exatidão o/os alelos dos pacientes em estudo.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a determinação das freqüências alélicas e gênicas dos pacientes e indivíduos controle sadios foi utilizada a contagem direta, de acordo com o método descrito por LAMM & DEGOS, 1979 e SIEGEL, 1979 .

A freqüência alélica é dada por:

$$F_a = \frac{na}{n}$$

onde:

F_a = freqüência do antígeno e /ou do alelo presente

na = número de indivíduos com o antígeno presente

n = número total de indivíduos estudados

A freqüência gênica é dada por:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - \frac{na}{n}}$$

onde:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - \underline{F_a}}$$

FG = Freqüência gênica

$\underline{F_a}$ = Freqüência alélica

A análise estatística de comparação entre as frequências alélicas e gênicas do grupo de pacientes e do grupo controle foi efetuada com o teste do Qui-quadrado χ^2 , utilizando a tabela de contingência 2x2” (DYER,P & WARRENS,A, 1994) e teste exato de Fisher, quando o menor valor esperado em uma das caselas era inferior a 5. E a significância estatística das diferenças entre os pacientes e grupo de indivíduos controle foi dada quando $p < 0,05$. O valor de p foi multiplicado pelo número de alelos estudados e comparações realizadas, $pc = p$ corrigido (SVEJGAARD & RYDER, 1994; LECHLER & WARRENS, 2000).

Tabela de contingência 2x2

	nºde indivíduos com antígeno A	nºde indivíduos sem antígeno A	TOTAL
População 1	a	b	$a + b$
População 2	c	d	$c + d$
Total	$a + c$	$b + d$	$N = a + b + c + d$

Sendo:

a = nºde indivíduos com antígeno A na população 1

b = nºde indivíduos sem antígeno A na população 1

c = nºde indivíduos com antígeno A na população 2

d = nºde indivíduos sem antígeno A na população 2

N = número total da população 1 + população 2

O cálculo do Qui-quadrado (χ^2) é dado então, aplicando a fórmula:

$$\chi^2 = \frac{[(a \times d) - (c \times b)]^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Para a associação entre um determinado alelo e a doença, a interpretação estatística é dada pela fórmula:

$$RR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

O risco relativo (RR) maior do que 1 significa uma associação positiva, isto é, quando há presença do antígeno, ocorre o aumento do risco da doença. Para um $RR < 1$, significa uma associação negativa, isto é, aqueles que carregam estes genes ou antígenos desenvolvem baixo risco na expressão da doença. O $RR > 3,0$ é altamente significativo.



4. RESULTADOS

4.1. TIPIFICAÇÕES DOS ALELOS HLA-DRB1, -DQB1 EM PACIENTES COM PSORÍASE VULGAR (P.V.) E NOS CONTROLES SADIOS

A análise detalhada do polimorfismo dos alelos HLA de classe II, DRB1, -B3, -B4, -B5 e DQB1, nos pacientes com P.V., e nos controles sadios está representada no Apêndice, Tabelas III e IV.

Os alelos HLA-DRB3, -B4, -B5 e HLA-DQB1 foram determinados nos pacientes com P.V. e nos controles sadios pelo método PCR/SSP por média resolução ou tipificação genérica, enquanto que os alelos HLA-DRB1 por alta resolução ou tipificação específica; no Apêndice, Tabela III, estão demonstradas as tipificações dos pacientes com Psoríase vulgar, e no Apêndice Tabela IV, estão demonstradas as tipificações dos indivíduos controle. Nota-se, pelas frequências observadas nos alelos tipificados, que a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg - Tabelas 1 e 2.

4.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GÊNICAS DETECTADAS POR PCR/SSP EM PACIENTES COM PSORÍASE VULGAR E NOS CONTROLES SADIOS

As frequências alélicas e gênicas detectadas nos dois grupos avaliados são mostradas nas Tabelas 1 e 2. Na primeira coluna das tabelas estão descritos os alelos definidos. As frequências antigênicas e gênicas estão nas colunas seguindo à direita. Foram definidos nos pacientes 114 alelos DRB1, 51 alelos DRB3, 23 alelos DRB4, 18 alelos DRB5 e 114 alelos DQB1, definidos por PCR/SSP média e alta resolução, tabelas 1 e 2. Foram definidos nos controles sadios 190 alelos DRB1, 72 alelos DRB3, 53 alelos DRB4, 26 alelos DRB5 e 190 alelos DQB1 – Tabelas 1 e 2.

TABELA 1: Distribuição das frequências alélicas e gênicas- HLA-DR e HLA-DQ nos pacientes com Psoríase Vulgar e no grupo controle

Alelos	Pacientes- Psoríase Vulgar		Controles	
	n=60		n=100	
	Frequência alélica	Frequência gênica	Frequência alélica	Frequência gênica
HLA-DRB1				
*01	12 (20,0%)	0,1055	21 (21,0%)	0,1112
*15	12 (20,0%)	0,1055	15 (15,0%)	0,0780
*16	6 (10,0%)	0,0513	11 (11,0%)	0,0566
*03	12 (20,0%)	0,1055	13 (13,0%)	0,0673
*04	9 (15,0%)	0,0780	35 (35,0%)	0,1937
*11	20 (33,3%)	0,1834	27 (27,0%)	0,1456
*12	2 (3,3%)	0,0167	1 (1,0%)	0,0050
*13	15 (25,0%)	0,1243	26 (26,0%)	0,1398
*14	3 (5,0%)	0,0253	7 (7,0%)	0,0356
*07	11 (18,3%)	0,0962	20 (20,0%)	0,1055
*08	6 (10,0%)	0,0513	10 (10,0%)	0,0514
*09	2 (3,3%)	0,0167	2 (2,0%)	0,0100
*10	4 (6,7%)	0,0338	2 (2,0%)	0,0100
Alelos	114		190	
definidos				
HLA-DRB3				
*01	20 (33,3%)	0,1815	32 (32,0%)	0,1754
*02	28 (46,7%)	0,2699	29 (29,0%)	0,1574
*03	3 (5,0%)	0,0253	11 (11,0%)	0,0566
Alelos	51		72	
definidos				
HLA-DRB4				
*01	23(38,3%)	0,2126	53 (53,0%)	0,3144
Alelos	23		53	
definidos				

Alelos	Pacientes- Psoríase Vulgar n=60		Controles n=100	
	Frequência alélica	Frequência gênica	Frequência alélica	Frequência gênica
HLA-DRB5				
*01	13 (21,7%)	0,1149	22 (22,0%)	0,1168
*02	5 (8,3%)	0,0425	4 (4,0%)	0,0202
Alelos definidos	18		26	
HLA-DQB1				
*05	27 (45,0%)	0,2584	36 (36,0%)	0,2000
*06	21 (35,0%)	0,1938	39 (39,0%)	0,2190
*02	21 (35,0%)	0,1938	34 (34,0%)	0,1876
*03	38 (63,3%)	0,3942	66 (66,0%)	0,4169
*04	7 (11,7%)	0,0598	15 (15,0%)	0,0780
Alelos definidos	114		190	

TABELA 2: Distribuição das frequências alélicas e gênicas HLA- DRB1 nos pacientes com Psoríase Vulgar e no grupo controle

Alelos	Pacientes Psoríase Vulgar n=60		Controles n=100	
	Frequência alélica(%)	Frequência gênica	Frequência alélica(%)	Frequência gênica
HLA-DRB1				
*0101	5 (8,3%)	0,0423	17 (17,0%)	0,0890
*0102	6 (10,0%)	0,0513	2 (2,0%)	0,0100
*0103	1 (1,7%)	0,0080	2 (2,0%)	0,0100
*1501	8 (13,3%)	0,0688	9 (9,0%)	0,0460
*1502	1 (1,7%)	0,0080	2 (2,0%)	0,0100
*1503	3 (5,0%)	0,0253	3 (3,0%)	0,0151
*1504	0 (0,0%)	0,0000	1 (1,0%)	0,0050
*1601	3 (5,0%)	0,0253	7 (7,0%)	0,0356
*1602	3 (5,0%)	0,0253	4 (4,0%)	0,0202
*0301	11 (18,3%)	0,0962	12 (12,0%)	0,0619
*0302	1 (1,7%)	0,0083	1 (1,0%)	0,0050
*0401	2 (3,3%)	0,0167	8 (8,0%)	0,0408
*0402	1 (1,7%)	0,0080	3 (3,0%)	0,0151
*0403	1 (1,7%)	0,0083	4 (4,0%)	0,0202
*0404	2 (3,3%)	0,0167	7 (7,0%)	0,0356
*0405	1 (1,7%)	0,0083	8 (8,0%)	0,0408
*0407	0 (0,0%)	0,0000	1 (1,0%)	0,0050
*0408	0 (0,0%)	0,0000	2 (2,0%)	0,0100
*0410	0 (0,0%)	0,0000	1 (1,0%)	0,0050
*0411	2 (3,3%)	0,0167	1 (1,0%)	0,0050
*0432	1 (1,6%)	0,0080	0 (0,0%)	0,0000
*1101	10 (16,7%)	0,0870	18 (18,0%)	0,0945
*1102	3 (5,0%)	0,0253	2 (2,0%)	0,0100

Alelos	Pacientes Psoríase Vulgar n=60		Controles n=100	
	Frequência Alélica(%)	Frequência gênica	Frequência alélica(%)	Frequência gênica
HLA-DRB1				
*1103	2 (3,3%)	0,0167	2 (2,0%)	0,0100
*1104	4 (6,7%)	0,0338	4 (4,0%)	0,0202
*1110	0 (0,0%)	0,0000	1 (1,0%)	0,0050
*1118	1 (1,7%)	0,0080	0 (0,0%)	0,0000
*1201	2 (3,3%)	0,0167	1 (1,0%)	0,0050
*1301	6 (10,0%)	0,0513	8 (8,0%)	0,0408
*1302	2 (3,3%)	0,0167	13 (13,0%)	0,0673
*1303	3 (5,0%)	0,0253	2 (2,0%)	0,0100
*1305	1 (1,7%)	0,0083	1 (1,0%)	0,0050
*1309	0 (0,0%)	0,0000	1 (1,0%)	0,0050
*1315	1 (1,7%)	0,0083	0 (0,0%)	0,0000
*1320	1 (1,7%)	0,0083	0 (0,0%)	0,0000
*1327	0 (0,0%)	0,0000	1 (1,0%)	0,0050
*1401	3 (5,0%)	0,0253	5 (5,0%)	0,0253
*1402	0 (0,0%)	0,0000	2 (2,0%)	0,0100
*0701	11 (18,3%)	0,0962	20 (20,0%)	0,1055
*0801	3 (5,0%)	0,0253	8 (8,0%)	0,0408
*0804	1 (1,7%)	0,0083	1 (1,0%)	0,0050
*0809	0 (0,0%)	0,0000	1 (1,0%)	0,0050
*0816	2 (3,3%)	0,0167	0 (0,0%)	0,0000
*0901	2 (3,3%)	0,0167	2 (2,0%)	0,0100
*1001	4 (6,7%)	0,0338	2 (2,0%)	0,0100
Alelos	114		190	
definidos				

4.3. ASSOCIAÇÃO COM OS ALELOS HLA-DRB E DQB1

As Tabelas 3 e 4 mostram a significância estatística dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 associados com a Psoríase Vulgar. Somente os alelos HLA-DRB3*02 e HLA-DRB1*0102 apresentaram um aumento da frequência nos paciente quando comparado com os controles (p/c= 46,7 e 29%) e (p/c= 10%, 2%) Tabelas 1 e 2, e ($\chi^2 = 5,10$, $p < 0,05$, $pc =$ não significativa e $RR = 2,14$) e ($p < 0,05$, $pc =$ não significativa e $RR = 5,44$) respectivamente, Tabelas 3 e 4. Observou-se ainda uma redução na frequência dos alelos dos pacientes, quando comparados aos controles sadios dos alelos, HLA-DRB1*04 (p/c= 15% e 35%, $\chi^2 = 7,52$, $p < 0,05$, $pc =$ não significativa, $RR = 0,33$) e HLA-DRB1*1302 (p/c= 3,3% e 13%, $p < 0,05$, $pc =$ não significativa, $RR = 0,23$). Tabelas 1, 2, 3 e 4. Em contraste, os alelos HLA-DQB1 não mostraram associação significativa com a P.V., Tabela 3.

TABELA 3: Significância estatística dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 associados com a Psoríase Vulgar (valor do χ^2 ausente, indica uso do teste exato de Fisher).

Alelos	χ^2	valor de p	Risco Relativo
HLA-DRB1			
*01	0,02	0,8977	0,94
*15	0,67	0,4136	1,42
*16	0,04	0,8425	0,90
*03	1,39	0,2378	1,67
*04	7,52	0,0061	0,33
*11	0,73	0,3945	1,35
*12		0,5567	3,41
*13	0,02	0,8884	0,95
*14		0,7444	0,70
*07	0,07	0,7962	0,90
*08	0,00	1,0000	1,00
*09		0,6310	1,70
*10		0,1983	3,50
HLA-DRB3			
*01	0,03	0,8616	1,06
*02	5,10	0,0239	2,14
*03		0,2542	0,43
HLA-DRB4			
*01	3,23	0,07	0,55
HLA-DRB5			
*01	0,002	0,9606	0,98
*02		0,2972	2,18
HLA-DQB1			
*05	1,27	0,2593	1,45
*06	0,26	0,6129	0,84
*02	0,02	0,8974	1,05
*03	0,12	0,7321	0,89
*04	0,35	0,5534	0,75

NS=não significante

TABELA 4: Significância estatística dos alelos HLA-DRB1 associados com a Psoríase
Vulgar (valor do χ^2 ausente, indica uso do teste exato de Fisher).

Alelos	χ^2	valor de p	Risco Relativo
HLA-DRB1			
*0101	2,38	0,1570	0,44
*0102		0,0533	5,44
*0103		1,0000	0,83
*1501	0,74	0,3892	1,56
*1502		1,000	0,83
*1503		0,6725	1,70
*1504		1,0000	0,00
*1601		0,7444	0,70
*1602		1,0000	1,26
*0301	1,22	0,2694	1,65
*0302		1,0000	1,68
*0401		0,3227	0,40
*0402		1,0000	0,55
*0403		0,6511	0,41
*0404		0,4854	0,46
*0405		1,0000	0,19
*0407		1,0000	0,00
*0408		0,5283	0,00
*0410		1,0000	0,00
*0411		0,5567	3,41
*0432		0,3750	0,00
*1101	0,05	0,8299	0,91
*1102		0,3643	2,58
*1103		0,6310	1,69
*1104		0,4745	1,71
*1110		1,0000	0,00
*1118		0,3750	0,00
*1201		0,5567	3,41

Alelos	χ^2	valor de p	Risco Relativo
HLA-DRB1			
*1301	0,19	0,6647	1,28
*1302		0,0508	0,23
*1303		0,3643	2,58
*1305		1,0000	1,68
*1309		1,0000	0,00
*1315		0,3750	0,00
*1320		0,3750	0,00
*1327		1,0000	0,00
*1401		1,0000	1,00
*1402		0,5283	0,00
*0701	0,07	0,7962	0,90
*0801		0,5383	0,61
*0804		1,0000	1,68
*0809		1,0000	0,00
*0816		0,1392	0,00
*0901		0,6310	1,69
*1001		0,1983	3,50

NS= não significativa

4.4. ASSOCIAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS HLA-DRB1 E DQB1

A Tabela 5 demonstra a comparação das frequências de haplótipos entre os pacientes com PV e os controles sadios. Foram detectados dois haplótipos associados positivamente à doença (DRB1*0102 DQB1*05, $p/c= 10,0\%$ e $2,0\%$, $p<0,05$ e $RR= 5,44$) e (DRB1*0701 DQB1*03, $p/c= 8,3\%$ e $1,0\%$, $p<0,02$ e $RR= 9,00$). Bem como um haplótipo associado negativamente à doença (DRB1*0405 e DQB1*03, $p/c= 0,0\%$ e $7,0\%$, $p<0,04$ e $RR=0,10$) e são mostrados na Tabela 6.

TABELA 5: Frequências dos haplótipos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 nos pacientes com Psoríase vulgar e no grupo controle

Haplótipos		Pacientes -60	Controles -100
DRB1*0101	DQB1*05	5(8,3%)	17(17,0)
DRB1*0102	DQB1*05	6(10,0%)	2(2,0%)
DRB1*0103	DQB1*05	1(1,7%)	2(2,0%)
DRB1*1501	DQB1*06	8(13,3%)	9(9,0%)
DRB1*1502	DQB1*06	1(1,7%)	2(2,0%)
DRB1*1503	DQB1*02	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1503	DQB1*06	2(3,3%)	3(3,0%)
DRB1*1504	DQB1*06	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*1601	DQB1*05	3(5,0%)	7(7,0%)
DRB1*1602	DQB1*05	2(3,3%)	1(1,0%)
DRB1*1602	DQB1*03	1(1,7%)	3(3,0%)
DRB1*0301	DQB1*02	11(18,3%)	12(12,0%)
DRB1*0302	DQB1*02	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*0302	DQB1*04	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*0401	DQB1*04	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*0401	DQB1*03	2(3,3%)	7(7,0%)
DRB1*0402	DQB1*03	1(1,7%)	3(3,0%)
DRB1*0403	DQB1*04	0(0,0%)	2(2,0%)
DRB1*0403	DQB1*03	1(1,7%)	2(2,0%)
DRB1*0404	DQB1*04	0(0,0%)	2(2,0%)
DRB1*0404	DQB1*03	2(2,3%)	5(5,0%)
DRB1*0405	DQB1*02	1(1,7%)	1(1,0%)
DRB1*0405	DQB1*03	0(0,0%)	7(7,0%)
DRB1*0407	DQB1*03	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*0408	DQB1*03	0(0,0%)	2(2,0%)
DRB1*0410	DQB1*04	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*0411	DQB1*03	2(3,3%)	1(1,0%)
DRB1*0432	DQB1*04	1(1,7%)	0(0,0%)

Haplótipos		Pacientes -60	Controles -100
DRB1*1101	DQB1*06	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1101	DQB1*03	9(15,0%)	18(18,0%)
DRB1*1102	DQB1*06	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*1102	DQB1*03	3(5,0%)	1(1,0%)
DRB1*1103	DQB1*03	2(3,3%)	2(2,0%)
DRB1*1104	DQB1*05	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1104	DQB1*03	3(5,0%)	4(4,0%)
DRB1*1110	DQB1*03	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*1118	DQB1*03	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1201	DQB1*03	2(3,3%)	1(1,0%)
DRB1*1301	DQB1*05	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1301	DQB1*06	5(8,3%)	8(8,0%)
DRB1*1302	DQB1*05	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*1302	DQB1*06	2(3,3%)	12(12,0%)
DRB1*1303	DQB1*02	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1303	DQB1*05	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1303	DQB1*03	1(1,7%)	2(2,0%)
DRB1*1305	DQB1*03	1(1,7%)	1(1,0%)
DRB1*1309	DQB1*06	0(0,0%)	1(1,7%)
DRB1*1315	DQB1*06	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1320	DQB1*06	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*1327	DQB1*06	0(0,0%)	1(1,7%)
DRB1*1401	DQB1*05	3(5,0%)	5(5,0%)
DRB1*1402	DQB1*03	0(0,0%)	2(2,0%)
DRB1*0701	DQB1*02	6(10,0%)	19(19,0%)
DRB1*0701	DQB1*03	5(8,3%)	1(1,0%)
DRB1*0801	DQB1*04	3(5,0%)	7(7,0%)
DRB1*0801	DQB1*03	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*0804	DQB1*04	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*0804	DQB1*03	1(1,7%)	0(0,0%)
DRB1*0809	DQB1*04	0(0,0%)	1(1,0%)
DRB1*0816	DQB1*04	2(3,3%)	0(0,0%)
DRB1*0901	DQB1*02	1(1,7%)	1(1,0%)
DRB1*0901	DQB1*03	1(1,7%)	1(1,0%)
DRB1*1001	DQB1*05	4(6,7%)	2(2,0%)

TABELA 6: Significância estatística dos haplótipos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 nos pacientes com Psoríase vulgar e no grupo controle

(valor do χ^2 ausente, indica uso do teste exato de Fisher).

Haplótipos		RR	χ^2	p
DRB1*0101	DQB1*05	0,44	2,38	0,1233
DRB1*0102	DQB1*05	5,44		0,0533
DRB1*0103	DQB1*05	0,83		1,0000
DRB1*1501	DQB1*06	1,56	0,74	0,3892
DRB1*1502	DQB1*06	0,83		1,0000
DRB1*1503	DQB1*02	0,00		0,3750
DRB1*1503	DQB1*06	1,11		1,0000
DRB1*1504	DQB1*06	0,00		1,0000
DRB1*1601	DQB1*05	0,70		0,7444
DRB1*1602	DQB1*05	3,41		0,5567
DRB1*1602	DQB1*03	0,55		1,0000
DRB1*0301	DQB1*02	1,65	1,22	0,2690
DRB1*0302	DQB1*02	0,00		1,0000
DRB1*0302	DQB1*04	0,00		0,3750
DRB1*0401	DQB1*04	0,00		1,0000
DRB1*0401	DQB1*03	0,46		0,3298
DRB1*0402	DQB1*03	0,55		0,6010
DRB1*0403	DQB1*04	0,00		0,5283
DRB1*0403	DQB1*03	0,83		1,0000
DRB1*0404	DQB1*04	0,00		0,5283
DRB1*0404	DQB1*03	0,66		0,7122
DRB1*0405	DQB1*02	1,68		1,0000
DRB1*0405	DQB1*03	0,00		0,0459
DRB1*0407	DQB1*03	0,00		1,0000
DRB1*0408	DQB1*03	0,00		0,5283
DRB1*0410	DQB1*04	0,00		1,0000
DRB1*0411	DQB1*03	3,41		0,5567

Haplótipos		RR	χ^2	p
DRB1*0432	DQB1*04	0,00		0,3750
DRB1*1101	DQB1*06	0,00		0,3750
DRB1*1101	DQB1*03	0,80	0,24	0,6242
DRB1*1102	DQB1*06	0,00		1,0000
DRB1*1102	DQB1*03	5,21		0,1487
DRB1*1103	DQB1*03	1,69		0,6310
DRB1*1104	DQB1*05	0,00		0,3750
DRB1*1104	DQB1*03	1,26		1,0000
DRB1*1110	DQB1*03	0,00		1,0000
DRB1*1118	DQB1*03	0,00		0,3750
DRB1*1201	DQB1*03	3,41		0,5567
DRB1*1301	DQB1*05	0,00		0,3750
DRB1*1301	DQB1*06	1,05	0,006	1,0000
DRB1*1302	DQB1*05	0,00		1,0000
DRB1*1302	DQB1*06	0,25		0,0826
DRB1*1303	DQB1*02	0,00		0,3750
DRB1*1303	DQB1*05	0,00		0,3750
DRB1*1303	DQB1*03	0,83		1,0000
DRB1*1305	DQB1*03	1,68		1,0000
DRB1*1309	DQB1*06	0,00		1,0000
DRB1*1315	DQB1*06	0,00		0,3750
DRB1*1320	DQB1*06	0,00		0,3750
DRB1*1327	DQB1*06	0,00		1,0000
DRB1*1401	DQB1*05	1,00		1,0000
DRB1*1402	DQB1*03	0,00		0,5283
DRB1*0701	DQB1*02	0,47	2,30	0,0979
DRB1*0701	DQB1*03	9,00		0,0281
DRB1*0801	DQB1*04	0,70		0,7444
DRB1*0801	DQB1*03	0,00		1,0000
DRB1*0804	DQB1*04	0,00		1,0000
DRB1*0804	DQB1*03	0,00		0,3750
DRB1*0809	DQB1*04	0,00		1,0000
DRB1*0816	DQB1*04	0,00		0,1392
DRB1*0901	DQB1*02	1,68		1,0000
DRB1*0901	DQB1*03	1,68		1,0000
DRB1*1001	DQB1*05	3,50		0,1983

Tabela 7: Associações positivas observadas para os alelos e haplótipos HLA-DRB, - DQB1, detectadas por SSP nos pacientes com Psoríase Vulgar

Associações positivas com os alelos HLA-DRB1*0102 e DRB3*02			
Alelos- HLA	χ^2	valor de <i>p</i>	Risco Relativo
DRB1*0102	5,10	0,0533	5,44
DRB3*02		0,0239 <i>pc=ns</i>	2,14
Associações positivas com os haplótipos:			
HLA-DRB1*0102/DQB1*05			
Haplótipo		valor de <i>p</i>	Risco Relativo
DRB1*0102/DQB1*05		0,0533	5,44
HLA-DRB1*0701/DQB1*03			
Haplótipo		valor de <i>p</i>	Risco Relativo
DRB1*0701/DQB1*03		0,0281	9,00

Ns= não significante

Tabela 8: Associações negativas observadas para os alelos e haplótipos HLA-DRB1 e – DQB1 detectadas por SSP nos pacientes com Psoríase Vulgar

Associações negativas com os alelos HLA-DRB1*1302 e DRB1*04			
Alelos- HLA	χ^2	valor de <i>p</i>	Risco Relativo
DRB1*1302	7,52	0,0508	0,23
DRB1*04		0,0061 <i>pc=ns</i>	0,33
Associação negativa com o haplótipo:			
HLA- DRB1*0405/DQB1*03			
Haplótipo		valor de <i>p</i>	Risco Relativo
DRB1*0405/DQB1*03		0,0459	0,00

Ns=não significante



5. DISCUSSÃO

5.1. ALELOS HLA-DRB1/DQB1 EM CONTROLES SADIOS

Os estudos relacionados ao polimorfismo e à distribuição dos genes HLA clássicos vêm sendo estabelecido ao longo do tempo, por meio de dados avaliados em numerosas populações humanas (TRACHTENBERG *et al.*,1988; IMANISHI *et al.*,1991; MIDDLETON *et al.*,2000; MARTINEZ-LASO *et al.*,2001). Esses conhecimentos referem-se às variações e às frequências dos genótipos HLA nos distintos grupos étnicos, e formadores das populações humanas em diferentes regiões geográficas, e são fatores importantes para o entendimento dos eventos biológicos e genéticos dessas populações, como exemplo a recombinação, mutação e conversão gênica dos genes HLA (DEGLI-ESPOSTI *et al.*,1992). O Sistema HLA representa a mais importante ferramenta para o estudo da origem dos grupos humanos, resultando em múltiplas aplicações para a investigação de uma série de questões relacionadas à biologia molecular, imunogenética, susceptibilidade à doenças e variabilidade populacional. Nesse contexto pode-se citar as frequências alélicas características de uma população as quais se perpetuaram no tempo, independente das migrações (BODMER,1972; MARSH *et al.*,2000b).

A atual população brasileira é constituída, na sua grande maioria, por indivíduos descendentes de índios americanos-ameríndios (GUERRA *et al.*,1992; BELICH *et al.*,1992; PETZL-ERLER, LUZ, SOTOMAIOR, 1993), de imigrantes oriundos dos países da Europa, mais especificamente da Espanha, Portugal, Itália, Alemanha (MORAES *et al.*,1993; MORAES *et al.*,1996), da África (MIGOT-NABIAS *et al.*,1999; ALVES-SILVA *et al.*,2000), e dos países orientais (BRAUN-PRADO *et al.*,2000).

Essa investigação do polimorfismo dos alelos HLA de classe II, na população de Campinas, região Sudeste do Brasil é a continuidade de um primeiro estudo anteriormente realizado, que teve como objetivo analisar os genes HLA, o sistema genético e os marcadores por DNA na referida população, utilizando de métodos de tipificação HLA por biologia molecular DNA-PCR/SSP (THOMAZ *et al.*,1998). A fim de realizar uma análise mais detalhada dos alelos HLA de classe II- DRB1, -B3, -B4, -B5 e -DQB1, e ampliar o número de amostras dos indivíduos controle da mesma população de Campinas, foram examinadas nessa pesquisa, duas populações humanas, uma constituída de 100 indivíduos controle sadios provenientes da região de Campinas, e outra constituída de 60 indivíduos com Psoríase Vulgar.

Na análise da população controle, foram encontrados muitos alelos e grupos de alelos predominantemente presentes entre populações, européias e africanas, por exemplo: HLA-DRB1*03- no estudo 13%, nos africanos 13,99% e nos europeus 11,11%, DRB1*09- no estudo 2%, nos africanos 1,96% e nos europeus 1,36% (IMANISHI *et al.*, 1991). Independente dessa tendência esperada, os resultados claramente revelam a alta diversidade e a mistura étnica desta população, uma vez que os alelos de classe II- HLA-DR e DQ, mais característicos entre os ameríndios vivendo no Brasil, e populações orientais (LAYRISSE *et al.*,1988) foram encontrados em porcentagens elevadas no grupo de brasileiros caucasóides pesquisados, tanto para HLA-DRB1 como DRB4. Os alelos observados em maior frequência para estes dois grupos: DRB1*04 e DQB1*03 são encontrados, em frequência elevada nos ameríndios - 40% e 66%, respectivamente, também estavam significativamente elevados neste estudo- 35,0% e 66,0%, respectivamente.

Além disso, foram encontrados em frequência elevada, certos alelos comuns em orientais: -DRB1*15 (15%) na população estudada e (14,35%) na população de orientais; DRB1*08 (10%) na população estudada e (6,49%) nos orientais; DRB1*14 (7%) na população estudada e (7,69%) em orientais; DQB1*06 (39%) na população estudada e (39,47%) em orientais, e DQB1*05 – (36%) na população estudada e (36,29%) na população de orientais (MARSH *et al.*, 2000b).

A alta variabilidade observada na população de estudo, conseqüente da grande heterogeneidade de origem dos indivíduos e das misturas entre indivíduos de etnias diferentes, resultou em dificuldades adicionais para a perfeita caracterização do polimorfismo HLA. Este fato reforça a necessidade de métodos de tipificação de alta resolução para discernir as especificidades individuais, isso porque a distribuição dos alelos de classe II em nossa população mostrou uma clara divisão entre outras populações caucasóides homogêneas e documentadas na literatura (IMANISHI *et al.*,1991; MIDDLETON *et al.*,2000). Nossos resultados revelam associações particulares, entre os alelos HLA - DRB e - DQB1, na composição de vários haplótipos encontrados, e estão em concordância com a amostra de indivíduos controle, anteriormente avaliada (THOMAZ *et al.*, 1998), bem como de outras populações caucasóides brasileiras (BRAUN-PRADO *et al.*,2000). Esses achados apresentam uma associação significativa,

quando comparados às frequências de outras populações caucasóides (MIDDLETON *et al.*,2000; BRAUN-PRADO *et al.*,2000; IMANISH *et al.*,1991; LOUZADA-JUNIOR *et al.*,2001). E a identificação de alelos e haplótipos, previamente não relacionados em uma área geográfica bem definida, pode refletir a transmissão desse alelo de uma população ancestral (AYLA, 1995; ALVES-SILVA *et al.*,2000), onde as características da população, possivelmente refletem especificidades biológicas e genéticas importantes em estudos presentes e futuros, de doenças associadas aos genes HLA nessa população.

Os alelos HLA são amplamente conhecidos pela sua associação com uma série de doenças de patogênese complexa (MC DEVITT & BODMER, 1972; KRAEMER *et al.*,2000; PARK *et al.*,1998; CABALLERO *et al.*,1999; GLADMAN *et al.*,2001; MACIEL *et al.*,2001), sendo a susceptibilidade para muitas dessas condições multifatorial e oligo ou poligênica (SVEJGAARD & RYDER, 1994). A contribuição relativa de cada fator para patogênese de uma certa doença pode diferir entre populações, dependendo das frequências características para os alelos HLA e a interação com outros fatores (PETZL-ERLER, 1999).

O conhecimento do padrão de polimorfismo e do desequilíbrio de ligação, nos diferentes grupos humanos, contribuem para a interpretação de suas doenças específicas, associadas aos alelos HLA no nível de população e de espécie (DE PABLO, GARCIA-PACHELO, VILCHES, 1997; MARSH *et al.*,2000b).

5.2. ALELOS HLA-DRB1/DQB1 NA PSORÍASE VULGAR

Em um estudo inicial feito em nosso laboratório, foram analisados 55 pacientes com Psoríase, e 313 indivíduos controle sadios, por técnicas sorológicas. Os resultados mostraram aumento estatisticamente significativo nas frequências dos antígenos HLA-A1,-A2,-Cw6,-Cw7, e HLA-DR7 e -DQ5 nos pacientes, quando comparado ao grupo controle; um dado importante encontrado, foi a presença dos antígenos Cw6 e Cw7, cujas frequências estavam significativamente aumentadas em pacientes com surgimento da doença em idade precoce (KRAEMER *et al.*,2000). Na presente investigação, avaliou-se a mesma população de 60 pacientes e 100 indivíduos controle sadios, aplicando técnicas de biologia molecular, DNA-PCR/SSP, a fim de identificar os alelos de classe II na Psoríase Vulgar.

A Psoríase difere em três aspectos importantes das demais doenças humanas associadas aos genes HLA: é a primeira doença, evidentemente herdada; não parece estar associada a um alelo específico, e sim a vários alelos e finalmente, em nenhuma outra doença foi relatada uma associação tão forte para alguns alelos e a doença (BARKER, 2001). O risco relativo para o desenvolvimento da Psoríase nas populações em geral é grande, aproximadamente 2%, em cada 100 indivíduos 6 tem a doença, ou 1 em 17 (LECHLER & WARRENS, 2000). Com relação às associações aos genes HLA, muitos trabalhos têm descrito um aumento das frequências dos alelos HLA de classe I (WHITE et al, 1972; ASAHINA, AKAZAKI, NAKAGAWA, 1991; ENERBÄCK *et al.*, 1997) e de classe II na Psoríase (SCHMITT-EGENOLF *et al.*, 1996; IKAHEIMO *et al.*, 1996).

A literatura especializada tem mostrado uma série de análises sobre as associações entre os alelos HLA e Psoríase Vulgar, (SCHMITT – EGENOLF *et al.*, 1993), relatam a associação da Psoríase tipo I com haplótipo HLA-DRB1*0701, DQA1*0201 e DQB1*0303; outro grupo (IKAHEIMO *et al.*, 1996) relatam a associação da Psoríase Vulgar com o haplótipo HLA-Cw6, DR7, -DQA1*0201. Ambos estudos apresentam um aumento nas frequências dos alelos de Classe II, e sempre incluindo o gene HLA-Cw6.

5.2.1. Associação positiva de alelos DRB1 e haplótipos DRB1/DQB1

Neste estudo, foram definidos 2 alelos em associação positiva nos pacientes analisados. Os alelos, -DRB1*0102 e -DRB3*02 estavam significativamente associados à Psoríase Vulgar -DRB1*0102 ($p < 0,05$, $RR = 5,44$) e -DRB3*02 ($p < 0,02$, $\chi^2 = 4,36$, $RR = 2,14$). A literatura não relata a ocorrência desses achados nos pacientes estudados.

Os haplótipos HLA-DRB1*0102/ DQB1*05 ($p < 0,05$ e $RR = 5,44$) e o haplótipo HLA-DRB1*0701/DQB1*03 ($p < 0,02$ e $RR = 9,00$), igualmente estavam significativamente associados na Psoríase Vulgar. A forte associação encontrada no haplótipo HLA-DRB1*0701/DQB1*03 foi também relatada em pacientes com Psoríase Vulgar na Alemanha (SCHMITH-EGENOLF *et al.*, 1996).

5.2.2. Frequência diminuída dos alelos HLA-DRB1 e haplótipo: HLA-DRB1/-DQB1

Os alelos HLA-DRB1*1302 ($p<0,05$, $RR=0,23$) e HLA-DRB1*04 ($\chi^2=6,55$, $p<0,01$ e $RR=0,33$), e o haplótipo HLA-DRB1*0405/DQB1*03 ($p<0,04$ e $RR=0,00$), mostraram ter um efeito protetor contra o desenvolvimento da Psoríase Vulgar, nos pacientes analisados. Não foi encontrada na literatura dados comparativos.

Todos os alelos e haplótipos com frequência diminuída apresentaram risco relativo <1 para o desenvolvimento da Psoríase Vulgar.

5.3. HAPLÓTIPOS HLA-DRB1/DQB1 E A MANIFESTAÇÃO PRECOCE DA DOENÇA

A presença do antígeno HLA-Cw6, relatada em trabalhos anteriores (ASAHINA *et al.*,1991; KRAEMER *et al.*,2000) encontra-se associada à idade de aparecimento da doença em pacientes com Psoríase Vulgar, apresentando uma incidência e frequência aumentada, entre aqueles que manifestaram a doença mais cedo (HENSELER & CHRISTOPHERS, 1990).

HENSELER & CHRISTOPHERS,1990 caracterizaram dois tipos de psoríase, associadas significativamente ao HLA-Cw6 , uma se manifestando mais cedo (<40 anos) em 73,8% dos pacientes e uma se manifestando nos pacientes com idade mais avançada (>40 anos), em 31,8% dos doentes. Essas observações parecem ser a causa mais provável da heterogeneidade na Psoríase Vulgar (MATTHEWS *et al.*, 1995).

Esse estudo identificou dois haplótipos HLA-DRB1*0701/DQB1*03 e HLA-DRB1*0102/DQB1*05 em 100% dos pacientes, com início da doença, em idade mais jovem (<40 anos).

Esses dados são significantes uma vez que tem sido descrito que o alelo HLA-Cw6 e o haplótipo HLA-Cw6/DR7 são importantes na hereditariedade da Psoríase Vulgar. Porém, a presença somente do gene HLA-Cw6 parece ser suficiente para indicar o significado clínico e o risco para a Psoríase (IKÄHEIMO, SILVENNOINEN, KARVONEN, 1996). Entretanto, a significância das associações com os alelos de classe II, podem também implicar em mecanismos patogênicos diferentes (SAEKI *et al.*, 1998).

Embora a patogênese da Psoríase ainda permaneça desconhecida, o presente trabalho mostra evidências claras de uma susceptibilidade genética, através dos dados moleculares observados nos alelos HLA e os resultados estatisticamente significantes encontrados, particularmente nas associações dos haplótipos HLA- DRB1 e - DQB1.

Esses fatos sugerem um possível papel dos alelos HLA de classe II -HLA-DRB e DQB1 na patogênese da Psoríase (KIRBY & GRIFFITHS, 2001).



6. CONCLUSÃO

Essa pesquisa nos permite concluir que a atual população branca de Campinas- Sudeste do Brasil é constituída por uma mistura de alelos predominantemente freqüentes nos grupos étnicos constituídos pelos, Ameríndios- índios americanos, caucasóides europeus, africanos e orientais, podendo ser classificada como caucasóide miscigenada.

Em comparação à população de pacientes com Psoríase Vulgar, foi possível definir uma associação significativa dos haplótipos HLA-DRB1*0102/DQB1*05 e HLA-DRB1*0701/DQB1*03, e o grupo de pacientes com o início precoce da doença. Sendo o resultado mais importante desse estudo, indicando uma possível associação com a patogênese da doença. Para as demais associações observadas, foi possível constatar significância com os alelos DRB, porém estudos futuros serão necessários para confirmar esses achados, com aumento da casuística e outros estudos controlados.



7. SUMMARY

In this thesis, we analyzed 100 healthy control individuals and 60 individuals with Psoriasis vulgaris of the population of Campinas, a city in the southeast of Brazil.

Typification of class II HLA alleles (HLA-DRB1-5 e DQB1) was carried out through the DNA/PCR/SSP molecular method at medium and high resolution. DNA was extracted through a salting-out procedure of peripheral blood of each individual participating in the research. 13 DRB1 alleles, 3 DRB3 alleles, 1 DRB4 allele, 2 DRB5 alleles, and 5 DQB1 alleles were quantified at a medium or generic resolution using the PCR/SSP technique for primers of "One Lambda"; and, 45 DRB1 alleles were quantified at a high resolution or specific resolution in analyzed patients.

Results analysis showed positive associations suggesting susceptibility to Psoriasis vulgaris for HLA-DRB3*02 ($p < 0,05$, $\chi^2 = 4,36$, $RR = 2,14$) and HLA-DRB1*0102 alleles ($p < 0,05$, $RR = 5,44$). Negative associations indicating protection from Psoriasis vulgaris were found for HLA-DRB4*01 ($p < 0,001$, $\chi^2 = 6,55$, $RR = 0,53$) and HLA-DRB1*1302 alleles ($p < 0,05$, $RR = 0,23$).

Analysis carried out in haplotypes revealed positive association for HLA-DRB1*0102/DQB1*05 ($p < 0,05$, $RR = 5,44$) and HLA-DRB1*0701/DQB1*03 alleles ($p < 0,02$, $RR = 9,00$).

Findings permit to define examined control population as Miscellaneous Caucasoide and suggest a possible association of the DRB1 allele with the group of patients showing an early onset of the illness. However, data has to be confirmed in future studies.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.-J.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F. - The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet*, **67**: 444-61, 2000.
- ANDERSON, G.; LARHAMMAR, D.; WIDMARK. - Class II genes of the Human Major Histocompatibility Complex. Organization and evolutionary relationship of the DR-beta genes. *J Biol*, **262**: 8748-58, 1987.
- ANDRESSEN, C. & HENSELER, T. - Inheritance of psoriasis. Analysis of 2035 family histories (in German). *Hautarzt*, **33**: 214-17, 1982.
- ASAHINA, A.; AKAZAKI, S.; NAKAGAWA, H. - Specific nucleotide sequence of HLA-C is strongly associated with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, **97**: 254-58, 1991.
- AYLA, F.J. - The myth of Eve: molecular biology and human origins. *Science*, **270**: 1930-36, 1995.
- BAADSGAARD, O.; GUPTA, A.K.; TAYLO, R.S.; ELLIS, C.N.; VOORHEES, J.J.; COOPER, K.D. - Psoriatic epidermal cells demonstrate increase numbers and function of non-Langerhans antigen-presenting cells. *J Invest Dermatol*, **92**: 190-5, 1989.
- BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D.E.; SPIES, T. - A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 6259-6263, 1994.
- BALENDRAN, N.; CLOUGH, R.L.; ARGUELLO, J.R. - Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol*, **113**: 322-8, 1999.
- BARKER, J.N.N. - Genetic aspects of psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, **26**: 321-5, 2001.
- BARKER, J.N.W.N. - The pathophysiology of psoriasis. *Lancet*, **338**: 227-30, 1991.

- BELICH, M.P.; MADRIGAL, J.A.; HILDEBRAND, W.H.; ZEMMOUR, J.; WILLIAMS, R.C.; LUZ, R.; PETZL-ERLER, M.L.; PARHAM, P. - Unusual HLA-B alleles in two tribes of brasilian Indians. *Nature*, **357**: 326-9, 1992.
- BENJAMIN, R. & PARHAM, P. - Guilt by association: HLA B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*, **11**: 137-42, 1990.
- BJERKE, J.R.; KROUGH, H.K.; MATRE, R. - Characterisation of mononuclear cell infiltrate in psoriatic lesions. *J Invest Dermatol*, **71**:340, 1978.
- BJORKMAN, P.J. & PARHAM, P. - Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecule. *Annual review of Biochemistry*, **59**: 253-88, 1990.
- BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROT, R.E.; CHARRON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A.; FAUCHET, R.; MACH, B.; MAYR, W.R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M.T.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P.I. - Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* **49**: 297-321, 1997.
- BODMER, W. - Evolution Significance of the HLA System. *Nature*, **309**: 425-30, 1972.
- BODMER, W.F.; ALBERT, E.; BODMER, J.G.; DAUSSET, J.; KISS-MEYER-NIELSEN, F.; MAYR, W.; PAYNE, R.; VAN ROOD, J.J.; WALFORD, R.L. - Nomenclature of factors of the HLA System. *Hum Immunol*, **11**:117-25, 1984.
- BOS, J.D. & DE RIE, M. A. - The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunology Today*, **40**: 40-5, 1999.
- BRANDRUP, F.; HOLM, N.; GRUNNET, N.; HENNINGSEN, K. - Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Dermato- Venereol*, **62**: 229-36, 1982.

- BRAUN-PRADO, K.; VIEIRA MION, A.L.; FARAH PEREIRA, N.; CULPI, L.; PETZLER, M.L. - HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens*, **56**: 417-27, 2000.
- BURDEN, A. D.; JAVED, S.; HODGINS, M. - Linkage to chromosome 6p and exclusion of chromosome 17q in familial psoriasis in Scotland. *Br J Dermatol*, **135**: 827, 1996.
- CABALLERO, A.; ALVÉS-LEÓN, S.; PAPAIS-ALVARENGA, R.; FERNÁNDEZ, O.; NAVARRO, G.; ALONSO, A. - DQB1*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens*, **54**: 524-6, 1999.
- CAMPBELL, R.D. & TROWSDALE, J. - Map of the human MHC. *Immunol Today*, **14**: 349-52, 1993.
- CASTELLINO, F.; ZHONG, G.; GERMAIN, R.N. - Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol*, **54**: 159-69, 1997.
- CEREB, N.; KONG, Y.; LEE, S.; MAYE, P.; YANG, S. Y. - Nucleotide sequences of MHC class I introns 1,2 and 3 in humans and intron 2 in nonhuman primates. *Tissue Antigens*, **47**: 498-511, 1996.
- CERIO, R.; GRIFFITHS, C.E.M.; COOPER, K.D.; NICKOLOFF, B.J.; HEADINGTON, J.T. - Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol*, **121**: 421-31, 1989.
- CHANG, J.C.C.; SMITH, L.R.; FRONING, K. - CD8⁺ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor Vβ3 and/or Vβ 13.1 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 9282-86, 1994.
- CHRISTOPHERS, E. - Psoriasis- epidemiology and clinical spectrum. *Clinical and Experimental Dermatology*, **26**: 314-20, 2001.
- CHRISTOPHERS, E. & HENSELER, T. - Psoriasis types I and II as subtypes of nonpustular psoriasis. *Semin Dermatol*, **11**: 261-6, 1992.

- CHO, S.; ATTAYA, M.; MONACO, J.J. - New class II- like genes in the murine MHC. *Nature*, **353**: 573-6, 1991.
- DAUSSET, J. - The major histocompatibility complex in man. *Science*, **213**: 146-7, 1981.
- DEGLI-ESPOSTI, M.A.; LEAVER, A.L.; CHRISTIANSEN, F.T.; WITT, C.S.; ABRAHAM, L.J.; DAWKINS, R.L. - Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. *Hum Immunol*, **34**:242-52, 1992.
- DEMIDEM, A.; TAYLOR, J.R.; GRAMMER, S.F.; STREILEIN, J.W. - Comparison of effects of transforming growth factor-beta and cyclosporin A on antigen-presenting cells of blood and epidermis. *J Invest Dermatol*, **96**: 401-7, 1991.
- DE PABLO, R.; GARCIA-PACHECO, J.M.; VILCHES, C. - HLA class II allele distribution in the Bubi population from the island of Bioko (Equatorial Guinea). *Tissue Antigens*, **50**:593-601, 1997.
- DRAKE, C.G.; KOTZIN, B.L. - Superantigens: biology, immunology, and potential role in disease. *J Clin Immunol*, **12**: 149- 62, 1992.
- DYER, P. & WARRENS, A. - Design and interpretation of studies of the major histocompatibility complex in disease. In: LECHLER, R (ed). *HLA & Disease*. San Diego, Academic Press, p. 93-121, 1994.
- ELDER, J.T.; NOIR, R.P.; VORHEES, J.J. - Epidemiology and genetics of psoriasis. *J Invest Dermatol*, **102**: S24-S27, 1994.
- ENERBÄCK, C.; MARTINSSON, T.; INEROT, A.; WAHLSTRÖM, J.; YHR, M.; SWANBERCK, G. - Evidence that HLA-CW6 determines early onset of psoriasis, obtained using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Acta Derm Venereol*, **77**: 273-6, 1997.
- FARBER, E.M.; NALL, M.L.; WATSON, W. - Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Dermatol*, **109**: 207-11, 1974.

- FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W. - A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics*, **13**: 399-403, 1996.
- FERENCZI, K.; BURACK, L.; POPE, M.; KRUEGER, J.G. ; AUSTIN, L.M. - CD69, HLA-DR and the IL-2R Identify Persistently Activated T cells in Psoriasis Vulgaris Lesional Skin: Blood and Skin Comparisons by Flow Cytometric. *Journal of Autoimmunity*, **14**: 63-78, 2000.
- GLADMAN, D.D.; FAREWELL, V.T.; RAHMAN, P.; SCHENTAG, C.T.; PELLETT, F.; MING NG, C. & WADE, J.A. - HLA-DRB1*04 Alleles in Psoriatic Arthritis: Comparison With Rheumatoid Arthritis and Healthy Controls. *Human Immunology*, **62**: 1239-44, 2001.
- GLYNNE, R.; POWIS, S.H.; BECK, S. - A proteasome- related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature*, **353**: 357-60, 1991.
- GOLDBERG, A. L. & ROCK, K.L. - Proteolysis , proteosomes and antigen presentation. *Nature* , **357**: 375-9, 1992.
- GORER, P.A. - Genetic and Antigenic basis of tumor transplantation. *J Pathol bacteriol*, **44**: 691-7, 1937.
- GOTTLIEB, A.B & KRUEGER, J.G. - Role of T- lymphocytes (in psoriasis pathogenesis): In Dubertret L (ed): Psoriasis. Brescia. ISED, p. 63-71, 1994.
- GRIFFITHS, T.W.; GRIFFITHS, C.E.M.; VOORHEES, J.J. - Immunopathogenesis and immunotherapy of psoriasis. *Dermatol Clin*, **13**: 739-49, 1995.
- GRUEN, J.R.; NALABOLU, S.R.; SHU, T.W. - A transcription map of the major histocompatibility complex (MHC) class I region. *Genomics*, **36**: 70-85, 1996.
- GUERRA, L.K.; REHFELDT, I.R.; LIMA, M.T.; PETZL-ERLER, M.L.; MESSIAS, I.J.T. - BF and C3 Genetic Polymorphisms in Kaingang Indians from Southern Brazil. *Hum Hered*, **42**: 153-6, 1992.

- HAMMERBERG, C.; AREND, W.P.; FISHER, G.J.- Interleukin-1 receptor antagonist in normal and psoriatic epidermis. *J Clin Invest*, **90**:571-83, 1992.
- HANCOCK, G.E.; KAPLAN, G.; COHN, Z.A. - Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. *J Exp Med*, **168**: 1395-402, 1988.
- HENSELER, T. - The genetics of psoriasis. *J Am Dermatol*, **37**: S1-S11,1997.
- HENSELER, T. & CHRISTOPHERS, E. - Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, **32**: 982-986, 1995.
- HENSELER, T. & CHRISTOPHERS, M.D. - Psoriasis of early and late onset: Characterization of two types of psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **13**: 450-6, 1990.
- HURLEY, C.K. - Acquisition and use of DNA-based HLA typing data in bone marrow registries. *Tissue Antigens*, **49**: 323-8, 1997.
- IKÄHEIMO, I.; SILVENNOINEN, K.S.; KARVONEN, J. - Immunogenetic profile of psoriasis vulgaris association with haplotypes A2, B13, CW6, DR7, DQA1*0201 and A1, B17, CW6, DR7, DQA1*0201. *Arch Dermatol Res*, **288**: 63-67, 1996.
- IKÄHEIMO, I.; SILVENNOINEN-KASSINEN, S.; KARVONEN, J.; TIILIKAINEN, A. - Alanine at position 73 of HLA-C is associated with psoriasis vulgaris in Finland. *Br J Dermatol*, **131**: 257-9, 1994.
- IMANISHI, I.; AKAZA, T.; KIMURA, A.; TOKUNAGA, K.; GOJOBORI, T. - Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In Tsuji,K.; Aizawa, M.; Sasazuki, T (eds): HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference. Vol. 1. Oxford, UK, Oxford University Press, p. 1065, 1991.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS,P.; HUNT,S.; WALPORT,M. - *Immunology*: The Immune System in Health and Disease. 3 th (ed) Garland Publishing Inc. USA, 535p, 1997.

- JENISCH, S.; HENSELER, T.; WESTPHAL, E. - HLA-DQ9 (DQB1*0303) increases susceptibility to type I psoriasis in multiplex families but only in the presence of HLA-CW6. *J Invest Dermatol*, **104**: 629, 1995.
- JONSSON, A.-K.; HYLDIG-NIELSEN, J.-J.; SERVENIUS, B. - Class II genes of the Human Major Histocompatibility Complex. Comparisons of the DQ and Dx alpha and beta genes. *J Biol Chem*, **262**: 8767-77, 1987.
- KIRBY, B. & GRIFFITHS. - Psoriasis: the future. *British journal of Dermatology*, **144**: 37-43, 2001.
- KISSMEYER-NIELSEN & DICK- Introduction to HLA Genetics. In: DICK, H.M. & KISSMEYER-NIELSEN, F. (eds)- *Histocompatibility Techniques*. Elsvier/North-Holland and Biomedical Press, Amsterdam, pp. 9-38, 1979.
- KLEIN, J. & SHEREFFLER, D.C. - The H-2 model for the major Histocompatibility Systems. *Transpl.Rev*, **6**: 3-29, 1971.
- KRAEMER, M.H.S.; UTHIDA-TANAKA, A.M.; OLIVEIRA, V.C.; BIRAL, A.C.; CARDOSO, C.B.; MAGALHÃES, R.F.; MAGNA, L.A.; Early-onset of Psoriasis in Brazilian patients: Support for HLA-Class I and II Analysis. In: SIRISINHA, S.; CHAIYAROJ, S.C.; TAPCHAI SRI, P. (ed) 2nd CONGRESS OF THE FEDERATION OF IMMUNOLOGICAL SOCIETY OF ASIA-OCEANIA. Bologna, Italy: Monduzzi Editore, *International Procedures Division*, v.I, 69-73, 2000.
- KRISTESEN, M.; DELEURAN, B.; EEDY, D.J.; FELDMANN, M.; BREATHMACH, S.M.; BRENNAN, F.M. - Distribution of interleukin I receptor antagonist protein (IRAP), interleukin I receptor, and interleukin Ia in normal and psoriatic skin. Decreased expression of IRAP in psoriatic lesional epidermis. *Br J Dermatol*, **127**: 305-11, 1992.

- LAMM, L.U.& DEGOS,L. - Introduction to HLA genetics. In: DICK, H.M.& KISSMEYER-NIELSEN,F.(eds). Histocompatibility techniques, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 131-62p.,1979.
- LAYRISSE, Z.; HEINEN, H.D.; BALBAS, O.; GARCIA, E.; STOIKOV, Z. - Unique HLA-DR/DQ associations revealed by family studies in Warao Amerindians. Haplotype and homozygosity frequencies. *Hum Immunol*, **23**: 45, 1988.
- LECHLER, R. Mechanisms of HLA and disease associations. In: Lecher, R.(editor) *HLA & disease* . London ,Academic Press, p. 83-91, 1994.
- LECHLER, R. & WARRENS, A. Appendix: Statistical Considerations in Analysing HLA and Disease Associations. In: Lechler, R. & Warrens, A. (ed) *HLA in Health and Disease*. London ,Academic Press, p 129-37, 2000.
- LECHLER, R. & WARRENS, A. - HLA and Dermatological Disease. In: Lechler, R. & Warrens, A. (ed) *HLA in Health and Disease*. London, Academic Press, p 365-86, 2000.
- LEE, R.E.; GASPARI, A. A. ; LOTZE, M.T.; CHANG, A. E.; ROSENBERG, S.A. - Interleukin-2 and psoriasis. *Arch Dermatol*, **124**: 1811, 1988.
- LEHNER, P.J. & TROWSDALE, J. - Antigen processing: coming out gracefully. *Curr Biol*, **8**: R605-R608, 1998.
- LEUNG, D.Y.M.; WALSH, P.; GIORNO, R.; NORRIS, D.A. - A potential role for super-antigens in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*, **100**: 225-8, 1993.
- LEWIS, H.M.; BAKER, B.S.; BOKTH, S. - Restricted T-cell receptor V β gene usage in the skin of patients with gutate and chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* , **129**: 514-20, 1993.
- LOMHOLT, G. - **Psoriasis: Prevalence,Spontaneous Course and Genetics**: a Census Study in the Prevalence of Skin Diseases on the Faroe Islands. GEC Gad: Copenhagen, 1963.

- LOUZADA-JUNIOR, P.; SMITH, A.G.; HANSEN, J.A.; DONADI, E.A. - HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. *Tissue Antigens*, **57**: 158-62, 2001.
- MACIEL, L.M.; RODRIGUES, S.S.; DIBBERN, R.S.; NAVARRO, P.A.; DONADI, E.A. - Association of the HLA-DRB1*0301 and HLA-DQA1*0501 alleles with Graves disease in a population representing the gene contribution from several ethnic backgrounds. *Thyroid* **11**: 31-5, 2001.
- MARSH, S.G.E.; BODMER, J.G.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROP, R.E.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A.; HANSEN, J.A.; MACH, B.; MAYR, W.R.; PARHAM, P.; PETERSDORF, E.W.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M.TH.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P.I. - Nomenclature for Factors of the HLA System, 2000. *Hum Immunology*, **62**: 419-68, 2001.
- MARSH, S. G. E.; PARHAM, P.; BARBER, L. D. - Hla and Disease . In: MARSH, S. G. E.; PARHAM, P.; BARBER, L. D.; (ed). **The HLA**. San Diego, Califórnia, Academic Press, p.79-83, 2000a.
- MARSH, S.G.E.; PARHAM, P.; BARBER, L.D. - HLA-DR In: MARSH, S.G.E.; PARHAM, P.; BARBER, L.D. (ed) **The HLA**. San Diego, Califórnia, Academic Press. p.330-390, 2000b.
- MARTINEZ-LASO, J.; SARTAKOVA, M.; ALLENDE, L.; KONENKOV, V.; MOSCOSO, J.; SILVERA-REDONDO, C.; PACHO, A.; TRAPAGA, J.; GOMEZ-CASADO, E. ARNAIZ-VILLENA, A. - HLA molecular markers in Tuvinians: a population with both Oriental and Caucasoid characteristics. *Ann Hum Genet*, **65**: 245-61, 2001.
- MATTHEWS, D.; FRY, L.; POWLES, A.; WEISSENBAACH, J.; WILLIAMSON, R. - Confirmation of genetic heterogeneity in familial psoriasis. *J Med Genet*, **32**: 546-8, 1995.

- MC DEVITT, H.O. & BODMER, W.F. - Histocompatibility antigens immune responsiveness and susceptibility to disease. *Am J Med*, **52**:1-8, 1972.
- MIDDLETON, D.; WILLIAMS, F.; MEENAGH, A.; DAAR, A.S.; GORODEZKY, C.; HAMMOND, M.; NASCIMENTO, E.; BRICENO, I.; PEREZ, M.P. - Analysis of the Distribution of HLA-A Alleles in Populations from Five Continents. *Human Immunology*, **61**:1048-52, 2000.
- MIGOT-NABIAS.; FAJARDY, I.; DONZE, P.M.; EVERAERE, S.; MAYOMBO, J.; MINH, T.N.; RENAUT, A.; GEORGES, A.J. - HLA class II polymorphism in a Gabonese Banzabi population. *Tissue Antigens*, **53**: 580-5, 1999.
- MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. - A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA for Human Nucleated Cells. *Nuclei Acids Res*, **16**: 1215, 1988.
- MORAES, M.E.; FERNANDEZ-VIÑA, M.; SALATIEL, I.; TSAI, S.; MORAES, J.R.; STASTNY, P. - HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. *Tissue Antigens*, **41**: 238-42, 1993.
- MORAES, J.R.F., MORAES, M.E.H – Distribuição dos alelos HLA na população brasileira. *Hematologia Hemoterapia* **1** :18-23, 1996.
- MORGANROTH, G.S.; SHAN, L.S.; WEINSTEIN, G.D.; VOORHEES, J.J.; COOPER, K.D. - Proliferation cells in psoriatic dermis are comprised primarily of T cells, endothelial cells, and factor XIIIa+ perivascular dendritic cells. *J Invest Dermatol*, **96**: 333-40, 1991.
- MOSSMAN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. - Two types of murine helper T cell clones I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, **136**: 2348-57, 1986.
- NAIR, R.P.; HENSELER, T.; JENISH, S.; STUART, P. - Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA ad 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Genet*, **6**:1349-56, 1997.

- NICKOLOFF, B.J. & GRIFFITHS, C.E.M. - T lymphocytes and monocytes bind to keratinocytes in frozen sections of biopsy specimens of normal skin treated with gamma interferon. *J Am acad Dermatol*, **20**: 736-43, 1989.
- NICKOLOFF, B.J.; KARABIN, G.D.; BARKER, J.N.W.N. - Localization of Il-8 and its inducer TNF- α . *Am J Pathol*, **138**:129-40, 1991.
- NICKOLOFF, B.J.; TURKA, L.A. MITRA, R.S. - Direct and indirect control of T- cell activation by keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **105**: 25-9, 1995.
- NIKAEIN, A.; PHILLIPS, C.; GILBERT, S.C.; SAVINO, D.; SILVERMAN, A.; STONE, M.J.; MENTER, A. - Characterization of skin- infiltrating lymphocytes in patient with psoriasis. *J Invest Dermatol*, **96**:3-9, 1991.
- OZAWA, A.; OHKIDO, M.; INOKO, H. - Specific restriction fragment length polymorphism on the HLA-C region and susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, **90**: 402-5, 1988.
- PARHAM, P.; LOMEN, C.E.; LAWLOR, D.A.; WAYS, J.P.; HOLMES, N.; COPPIN, H.L.; SALTER, R.D.; WAN, A.M.; ENNIS, P.D. - Nature of polymorphism in HLA-A,-B,-C molecules. *Proc Natl Acad Sci*, USA **85**:4005-9, 1988.
- PARHAM, P. & OHTA, T. - Population biology of antigen presentation by MHC Class I molecules. *Science*, **272**: 67-74, 1996.
- PARK, Y.S.; WANG, C.Y.; KO, K.W.; YANG, S.W.; PARK, M.; YANG, M.C.K. & SHE, J.X. - Combinations of HLA DR and DQ Molecules Determine the Susceptibility to Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Koreans. *Human Immunology*, **59**: 794-801, 1998.
- PETZL-ERLER, M.L. - Genetics of the immune responses and disease susceptibility. *Ciência e Cultura*, **51**: 199-211, 1999.

- PETZL-ERLER, M.L.; LUZ, R.; SOTOMAIOR, V.S. - The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indians tribes: The Kaingang and the Guarani. *Tissue Antigens*, **41**: 227-37, 1993.
- PIETERS, J. - MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, **9**: 89-96, 1997.
- PRINZ, J.C.; VOLLMER,S.; BOEHNCKE,W-H.; MENSSEN,A.; LAISNEY,I.; TROMMLER,P. - Selection of conserved TCR VDJ rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *Eur J Immunol*, **29**: 3360-8, 1999.
- RADCLIFFE-CROCKER, H. - *Disease of the Skin* (3rd edn), H.K.Lewis., 1883.
- RIVITTI, E.A.& SAMPAIO,S.A. - Erupções Eritêmato-Escamosas. In: Rivitti, E. and Sampaio, S.A. *Dermatologica*. Artes Médicas, p.170-5, 2000.
- ROOD,J.J. van LEEUWEN; A. Van and FERNISSE, J.G. - The Eurotransplant story. In *History of Transplantation: Thirty-Five Recollections* (ed. P.I. Terasaki), pp. 497-510,1991.
- SAED, G.; FIVENSON, D.P.; NAIDU, Y.; NICKOLOFF, B.J. - Mycosis fungoides exhibits a TH1 cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome express a TH2-type profilic.*J Invest Dermatol*, **103**: 29-33, 1994.
- SAEKI, H.; KUWATA, S.; NAKAGAWA, H.; ASAHINA, A.; TAMAKI, K.; SHIBATA, Y.; JUJI, T. - Analysis of HLA Class II and TAP Alleles in Japanese Patients with Psoriasis Vulgaris. *Human Immunology*, **59**: 503-11, 1998.
- SNELL, G.D. - The H-2 locus of the mouse: observations and specuations concerning its comparative genetics and its polymorphism. *Folia Biologica (Praha)*, **14**: 335-58, 1968.

- SCHMIDT-EGENOLF, M.; BOEHNCKE, W-H.; STÄNDER, M.; EIERMANN, T.H.; STERRY, W. - Oligonucleotide typing reveals association of type I psoriasis with the HLA-DRB1*0701/2, - DQA1*0201, - DQB1*0303 extended haplotype. *J Invest Dermatol*, **100**: 749-52, 1993.
- SCHMITT-EGENOLF; EIERMANN, T.H.; BOEHNCKE, W.H.; STANDER, M.; STERRY, W. - Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) Class I side of the extended haplotype CW6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303. A population and family- based study. *J Invest Dermatol*, **106**: 711-4, 1996.
- SIEGEL, S. - Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. São Paulo, Editora McGraw-Hill do Brasil, Ltda., 350p, 1979.
- SINHA, A. A.; LOPEZ, M.T.; MCDEVITT, H.O. - Autoimmune disease: the failure of self tolerance. *Science*, **248**: 1380-8, 1990.
- STERN, L.J.; BROWN, J.H.; JARDETZKY, T.S. - Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, **368**: 215-21, 1994.
- STRANGE, P.; COOPER, K. D.; HANSEN, E.R. - T- lymphocyte clones initiated from lesional psoriatic skin release growth factors that induce keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol*, **101**: 695-700, 1993.
- STREILEIN, J.W. - Speculation on the immunopathogenesis of psoriasis T cell violation of keratinocyte sphere of influence. *J Invest Dermatol*, **95**: 20S-21S, 1990.
- SVEJGAARD, A. & RYDER, L.P. - HLA and disease associations: detecting the strongest associations. *Tissue Antigens*, **43**: 18-27, 1994.
- SWERLICK, R.A.; CUNNINGHAM, M.W.; HALL, N.K. - Monoclonal antibodies cross-reactive with group A streptococci and normal and psoriatic human skin. *J Invest Dermatol*, **87**: 367-71, 1986.

- TERASAKI, P.I. & GJERTSON, D.W. - HLA Polymorphism: Origin and Maintenance. In: Terasaki, P.I. & Gjertson, D.W. (ed). *HLA 1997*. Published by UCLA Tissue Laboratory Los Angeles, California 90095. p.1-6, 1997.
- TIWARI, J.L. & TERASAKI, P.I. *Mechanisms of Hla and disease association*. In: Tiwari, J.L.; Terasaki, P.I.(Editors) Springer-Verlag, New York, 28-31, 1985.
- TOMFOHRDE, J.; SILVERMAN, A.; BARNES, R.; FERNANDEZ-VINA, M.A. YOUNG, M.; LORY, D.; MORRIS, L.; WUEPPER, K.D.; STASTNY, P.; MENTER, A.; BOWCOCK, A. - Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* **264**: 1141-5, 1994.
- THOMAZ, E.M.; SAKAMOTO, A.M.; DONADI, E.A. MAGNA, L.A.; KRAEMER, M.H.S. - Molecular analysis and distribution of the MHC class II alleles and haplotypes in the Brazilian Population. *International Proceeding Division*, Bologna, V.2, p.169-72, 1998.
- TOWNSEND, A. & TROWSDALE, J. - The transporters associated with antigens processing. *Semin Cell Biol*, **4**:53-61, 1993.
- TRACHTENBERG, A.; JOBIN, L.F.J.; KRAEMER, E.; SALZANO, F.M.; MORAES, M.E.H.; MORAES, J.R.F.; GERBASE, DE LIMA, M.; ARCE-GOMES, B.; FERREIRA, E. - The HLA polymorphism in five Brazilian populations. *Anns Hum Biology*, V.15, p.213-21, 1988.
- TREMBATH, R.C.; CLOUGH, R.L.; ROSBOTHAM, J.L. - Identification of a major susceptibility gene locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet*, **6**: 813-20, 1997.
- TROWSDALE, J. & KELLY, A. - The human HLA class II α chain gene DZ α is distinct from genes in the DP, DQ, and DR subregion. *EMBO J*, **4**: 2231-7, 1985.

- VALDIMARSSON, H.; BAKER, B.S.; JONSDOTTIR, I.; FRY, L. - Psoriasis: a disease of abnormal Keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today*, 7: 256-9, 1986.
- VALDIMARSSON, H.; BAKER, B.S.; JONSDOTTIR, I.; POWLES, A.; FRY, L. - Psoriasis: a T-cell mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today*, 16: 145-9, 1995.
- WHITE, S.; NEWCOMER, V.D.; MICKEY, M.R.; TERASAKI, P.I. - Distribution of HLA antigen frequency in psoriasis. *N Engl J Med*, 287: 740-3, 1972.
- WIERTZ, E.J.H.J.; MUKHERJEE, S.; PLOEGH, H.L. - Viruses use stealth technology to escape from the host immune system. *Molec Med Today*, 3 : 116-23, 1997.
- ZETTERQUIST, H & OLERUP, O. - Identification of the HLA-DRB1*04, -DRB1*07, AND -DRB1*09 alleles by amplification with sequence-specific primers (SSP) in 2 hours. *Hum Immunol*, 34(1): 64-74, 1992.



9. APÊNDICE

Tabela I - Caracterização dos indivíduos controle sadios, segundo sexo, idade.

Indivíduos	Sexo	Idade	Indivíduos	Sexo	Idade
1- JAV	M	43	51- FCC	M	36
2- JRS	M	30	52- MLB	M	28
3- JJM	M	41	53- NFS	M	34
4- JCF	M	51	54- VAGA	M	40
5- RFG	M	33	55- PHM	M	44
6- VS	M	27	56- LNF	M	37
7- MRN	M	26	57- NAR	M	34
8- ACS	M	25	58- MS	F	33
9- EPD	M	28	59- MCO	F	40
10- AH	M	50	60- AP	F	38
11- LAC	M	45	61- JARN	M	51
12- CRP	M	37	62- GRCV	M	36
13- CRL	F	31	63- MJS	F	25
14- LMB	F	37	64- JFF	M	38
15- ECC	M	37	65- AAMM	F	37
16- SLJ	F	30	66- MDCV	F	36
17- CF	M	53	67- MAM	F	40
18- JTR	F	29	68- MMN	M	22
19- SCIBC	F	38	69- MS	F	45
20- RSSO	F	30	70- CAB	M	52
21- DFCF	M	37	71- MNAS	F	44
22- RB	M	42	72- RFD	F	39
23- MAS	M	29	73- JAS	M	40
24- IO	M	31	74- MCM	F	18
25- LFG	M	38	75- MFS	F	43
26- JFS	M	37	76- MAM	M	46
27- LEBO	F	49	77- ALL	M	18
28- NNS	F	43	78- AJR	M	51
29- WBM	F	50	79- SCO	M	28
30- MAM	F	51	80- FOC	M	26
31- JOCL	M	46	81- CSR	F	40
32- RLBC	F	41	82- CBB	M	45
33- AR	M	40	83- OMS	M	41
34- RLO	M	43	84- ARS	M	51
35- SCB	F	33	85- BA	M	42

36- OCSF	M	32	86- ALS	M	33
37- LAOS	M	52	87- CASS	F	54
38- APPC	F	29	88- DAJ	F	35
39- ACFB	F	25	89- OPA	M	49
40- JBA	F	47	90- RAA	M	27
41- OFS	M	49	91- JAF	M	22
42- APS	F	24	92- RF	M	26
43- RHFA	M	29	93- FFT	M	23
44- ALP	M	25	94- LMB	F	35
45- CMTT	M	45	95- SAR	M	36
46- JRB	M	33	96- PJP	F	46
47- JBT	M	53	97- WCS	M	22
48- JAS	M	34	98- CSC	F	31
49- TATM	F	43	99- BJT	M	22
50- ABP	M	45	100- ALSJ	M	30

Tabela II - Distribuição dos pacientes, segundo idade, sexo e tempo de doença

Pacientes	Idade	Sexo	Tempo de doença (anos)
1- MSG	41	F	15
2- ABL	63	F	8
3- AO	84	F	79
4- NJF	51	M	21
5- BAS	48	M	14
6- EHL	17	M	8
7- MAA	33	M	4
8- JVM	59	M	12
9- MAOM	44	F	9
10- GHA	60	M	16
11- PAB	56	M	16
12- FRA	63	F	26
13- JLP	62	M	34
14- AB	54	M	20
15- LRD	60	F	37
16- ERC	66	F	10
17- MLN	32	F	5
18- SG	67	M	8
19- RV	37	M	21
20- NP	66	F	21
21- FAP	24	M	9
22- JLBC	41	M	20
23- SNN	61	F	30
24- MLPF	57	F	5
25- LCL	57	M	32
26- ECOC	23	F	12
27- MFSP	39	F	13
28- WR	61	M	11
29- LBS	40	F	5
30- RT	57	M	30

Pacientes	Idade	Sexo	Tempo de doença (anos)
31- CASP	56	F	5
32- VSB	40	M	10
33- OAS	73	F	31
34- JD	58	F	18
35- AM	65	M	15
36-LAS	19	F	16
37- LCF	55	F	19
38- EM	62	M	6
39- PR	61	M	9
40- TC	56	F	18
41- LGO	51	M	6
42- MDRO	44	F	5
43- SA	42	M	2
44- ALS	70	M	23
45- LMT	61	F	5
46- ORS	43	M	4
47- MPJS	51	F	35
48- APS	74	M	4
49- JJ	60	M	12
50- NS	64	M	6
51- LS	73	M	58
52- SRE	29	F	2
53- ECSR	26	M	2
54- SECM	43	F	12
55- EFMJ	41	M	7
56- VLM	48	F	8
57- JAS	39	M	3
58- GCS	71	F	14
59- JRL	54	M	20
60- NCP	68	F	25

TABELA III - Tipificação dos alelos HLA-DRB1, -B3, -B4, -B5 e DQB1 em pacientes com Psoríase Vulgar

Pacientes	HLA-DRB1		DRB3	DRB4	DRB5	DQB1
1- MSG	*1601	*1602			*01 *02	*05 *05
2- ABL	*0816	*1001				*05 *04
3- AO	*0404	*0701		*01 *01		*03 *03
4- NJF	*0301		*02			*02
5- BAS	*1101	*1303	*02 *02			*06 *02
6- EHL	*1102	*1001	*02			*05 *03
7- MAA	*0101	*0401		*01		*05 *03
8- JVM	*0101	*1301	*01			*05 *06
9- MAOM	*1501	*1602			*01 *02	*05 *06
10- GHA	*1501	*1305	*02		*01	*06 *03
11- PAB	*1101	*1104	*02 *02			*03 *03
12- FRA	*0102	*0701		*01		*05 *02
13- JIP	*1101	*1401	*01 *02			*05 *03
14- AB	*0816	*1320	*01			*06 *04
15- LRD	*1601	**0701		*01	*02	*05 *02
16- ERC	*0411	*1201	*02	*01		*03 *03
17- MLN	*1101	*0901	*02	*01		*03 *03
18- SG	*0101	*1601			*02	*05 *05
19- RV	*1104	*0701	*02	*01		*03 *03
20- NP	*0301		*02			*02
21- FAP	*0301	*1302	*01 *03			*06 *02
22- JLBC	*0301	*1401	*01 *02			*05 *02
23- SNN	*1501	*0701		*01	*01	*06 *02
24- MLPF	*1101		*02			*03
25- LCL	*0403	*1118	*02	*01		*03 *03
26- ECOC	*0102	*1301	*01			*05 *06
27- MFSP	*1301	*0701	*01	*01		*06 *03
28- WR	*0701	*0801		*01		*02 *04

Continuação...

Pacientes	HLA-DRB1		DRB3	DRB4	DRB5	DQB1
29- LBS	*1602	*1102	*03		*02	*03 *03
30- RT	*1501	*0405		*01	*01	*06 *02
31- CASP	*1501	*0901		*01	*01	*06 *02
32- VBS	*0102	*0411		*01		*05 *03
33- OAS	*1101	*1302	*01 *02			*06 *03
34- JD	*1101	*0701	*02	*01		*03 *03
35- AM	*1201	*1303	*01 *02			*05 *03
36- LAS	*0302	*1303	*01 *01			*03 *04
37- LCS	*0301		*02			*02
38- EM	*0801	*1001				*05 *04
39- PR	*0301	*1104	*01 *02			*02 *03
40- TC	*0401	*1301	*01	*01		*06 *03
41- LGO	*0404	*0432		*01 *01		*03 *04
42-MDRO	*0102	*0701		*01		*05 *03
43- AS	*1503	*1401	*02		*01	*05 *06
44- ALS	*0101	*1101	*02			*05 *03
45- LMT	*1104	*0701	*02	*01		*05 *02
46- ORS	*0102	*1301	*03			*05 *05
47- MPJS	*0102	*0402		*01		*05 *03
48- APS	*1301	*1315	*01 *01			*06 *06
49- JJ	*0103	*1101	*02			*05 *03
50- NS	*1502	*1103	*02		*01	*06 *03
51- LS	*0804	*1001				*05 *03
52- SRE	*1503	*1102	*02		*01	*06 *03
53- ECSR	*1103	*0801	*02			*03 *04
54- SECM	*0301		*01			*02
55- EFMJ	*1501	*0301	*01		*01	*06 *02
56- VLM	*1501	*0301	*01		*01	*06 *02
57- JAS	*1101		*02			*03
58- GCS	*0101	*1503			*01	*05 *02
59- JRL	*0301	*0701	*01	*01		*02 *02
60- NCP	*1501	*0301	*01		*01	*06 *02

TABELA IV- Tipificação dos alelos HLA-DRB1, -B3, B4, -B5 e HLA-DQB1 em indivíduos controle.

Indivíduos	HLA-DRB1		DRB3	DRB4	DRB5	DQB1
1- JAV	*0101	*1101	*01			*05 *03
2- JRS	*1501	*1102	*01		*01	*06 *06
3- JJM	*0101	*1101	*01			*05 *03
4- JCF	*1309	*1101	*01			*06 *03
5- RFG	*0401	*1101	*01	*01		*03 *03
6- VS	*1302	*0801	*01			*06 *04
7- MRN	*1503				*01	*06
8- ACS	*1503				*01	*06
9- EPD	*1502				*01	*06
10- AH	*0701	*1101	*01	*01		*02 *03
11- LAC	*0404	*1101	*01	*01		*03 *03
12- CRP	*1601	*1401	*01		*01	*05 *05
13- CRL	*1601	*0405		*01	*01	*05 *03
14- LMB	*1301	*0701	*02	*01		*06 *02
15- ECC	*0401	*1401	*01	*01		*05 *03
16- SLJ	*0701	*1104	*01	*01		*02 *03
17- CF	*0405	*1302	*01	*01		*06 *02
18- JTR	*1301	*0701	*02	*01		*02 *02
19- SCIBC	*1302		*03			*06
20- RSSO	*0401	*0701		*01		*02 *03
21- DFCF	*0401	*0701		*01		*02 *03
22- RB	*0401	*1110	*01	*01		*03 *03
23- MAS	*1301	*0701	*01	*01		*06 *02
24- IO	*0101	*1101	*03			*05 *03
25- LFG	*0102	*0701		*01		*05 *02
26- JFS	*0801	*1103	*02			*04 *03
27- LEBO	*0101	*0901		*01		*05 *02
28- NNS	*0101	*0410		*01		*05 *04
29- WBM	*0801	*1101	*02			*03 *04
30- MAM	*1302	*0101	*02			*06 *06
31- JOCL	*0403	*0404		*01		*04 *04

Indivíduos	HLA-DRB1		DRB3	DRB4	DRB5	DQB1
32- RLBC	*0701	*0801		*01		*02 *04
33- AR	*0404	*1104	*02	*01		*03 *03
34- RLO	*0701	*1402	*01	*01		*03 *02
35- SCB	*0101	*1101	*02			*05 *03
36- OCSF	*1501	*0407		*01	*01	*06 *03
37- AOS	*1305	*0404	*02	*01		*03 *04
38- APPC	*1101	*1401	*02			*05 *03
39- ACFB	*1001					*05
40- JBA	*1602	*0701		*01	*01	*05 *02
41- OFS	*0402	*0701		*01		*03 *02
42- APS	*1303	*0809	*01			*03 *04
43- RHFA	*1602	*0801			*01	*04 *03
44- ALP	*0701	*0901		*01		*02 *03
45- CMTT	*0403	*1302	*03	*01		*06 *03
46- JRB	*1601	*0801			*01	*05 *04
47- JBT	*0101	*1301	*02			*05 *06
48- JAS	*0701	*0103		*01		*05 *02
49- TATM	*0401	*0801		*01		*03 *04
50- ABP	*0101	*0801		*01		*05 *04
51- FCC	*1504	*0301	*02		*01	*06 *02
52- MLB	*0101	*1401	*02			*05 *05
53- NFS	*1302		*03			*06
54- VAGA	*1601				*01	*05
55- PHM	*1303		*01			*03
56- LNF	*0103	*1501			*01	*05 *06
57- NAR	*1501	*1101	*02		*01	*06 *03
58- MS	*0101	*0804				*05 *04
59- MCO	*0404	*1001		*01		*05 *03
60- AP	*1601	*1101	*02		*01	*05 *03
61- JARN	*0402	*1302	*03	*01		*06 *03
62- GRCV	*1502	*0405		*01	*01	*06 *03
63- MJS	*0101					*05
64- JFF	*0701	*1302	*03	*01		*05 *02
65- AAM	*1101	*1302	*02 *03			*06 *03
66- MDCV	*0701	*1601		*01	*02	*05 *02

Indivíduos	HLA-DRB1		DRB3	DRB4	DRB5	DQB1
67- MAM	*0405	*1501		*01	*01	*06 *03
68- MMN	*0408	*1201	*02	*01		*03 *03
69- MS	*0101	*1101	*02			*05 *03
70- CAB	*0101	*0301	*01			*05 *02
71- MNAS	*0301	*1327	*01 *01			*06 *02
72- RFD	*0301	*0408	*01	*01		*02 *03
73- JAS	*1102	*1101	*01 *02			*03 *03
74- MCM	*0301	*0411	*02	*01		*02 *03
75- MFS	*0402	*1301	*01	*01		*06 *03
76- MAM	*0101	*0701		*01		*05 *02
77- ALL	*0401	*1101	*02	*01		*03 *03
78- AJR	*1101	*1302	*02 *03			*06 *03
79- SCO	*1501	*0301	*01		*01	*06 *02
80- FOC	*0403	*0302	*01	*01		*02 *03
81- CSR	*1501	*0403		*01	*01	*06 *04
82- CBB	*0301	*1602	*02		*02	*02 *03
83- OMS	*1501				*01	*06
84- ARS	*0101	*1601			*02	*05 *05
85- BA	*1301	*1302	*01 *03			*06 *06
86- ALS	*0701	*1501		*01	*01	*06 *02
87- CAS	*0301	*1302	*02 *03			*06 *02
88- DAJ	*0101	*0401		*01		*05 *03
89- OPA	*0405	*1503		*01	*01	*06 *03
90- RAA	*0301	*1104	*01 *02			*02 *03
91- JAF	*0102	*0404		*01		*05 *03
92- RF	*0405	*1301	*01	*01		*06 *03
93- FFT	*0405	*1301	*01	*01		*06 *03
94- LMB	*0301	*1104	*01 *02			*02 *03
95- SAR	*1302	*1602	*03		*02	*06 *03
96- PJP	*1101	*1401	*01 *02			*05 *03
97- WCS	*0701	*0301	*02	*01		*02 *02
98- CSC	*0301	*1402	*01 *02			*02 *03
99- BJT	*0405	*0701		*01 *01		*03 *03
100- ALSJ	*0404	*1103	*02	*01		*03 *03