



---

**JOSIE FADUL VILELA**

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA  
INTERLEUCINA-1 (IL-1), IL1RN, IL-4, IL-6 E IL-10 EM  
PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE PÚRPURA  
TROMBOCITOPÊNICA IMUNE**

***INVESTIGATION OF INTERLEUKIN 1 (IL1), IL1RN, IL-4, IL-6  
AND IL-10 GENE POLYMORPHISM IN ADULT PATIENTS  
WITH IMMUNE THROMBOCITOPENIC PURPURA***

**CAMPINAS  
2012**



---

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**JOSIE FADUL VILELA**

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA  
INTERLEUCINA-1 (IL-1), IL1RN, IL-4, IL-6 E IL-10 EM PACIENTES  
ADULTOS PORTADORES DE PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA  
IMUNE**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Addas Carvalho**

***INVESTIGATION OF INTERLEUKIN 1 (IL1), IL1RN, IL-4, IL-6 AND IL-  
10 GENE POLYMORPHISM IN ADULT PATIENTS WITH IMMUNE  
THROMBOCITOPENIC PURPURA***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção do título de Mestra em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

*Master's Dissertation presented to the internal Medicine Posgraduate Program of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, for obtainment of Ph.D degree in Medical Sciences, specialization in Internal Medicine/Health Education.*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
PELA ALUNA JOSIE FADUL VILELA E  
ORIENTADO PELO PROF. DR. MARCELO ADDAS CARVALHO**

**Assinatura do Orientador**

-----

**CAMPINAS  
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

V711i	<p>Vilela, Josie Fadul, 1982- Investigação dos polimorfismos dos genes da interleucina-1 (IL-1), IL1RN, IL-4, IL-6 E IL-10 em pacientes adultos portadores de púrpura trombocitopênica imune / Josie Fadul Vilela. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador : Marcelo Addas de Carvalho. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Púrpura trombocitopênica idiopática. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Interleucinas. 4. Adultos. I. Carvalho , Marcelo Addas de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Investigation of interleukin 1 (IL1), IL1RN, IL-4, IL-6 and IL-10 gene polymorphism in adult patients with immune thrombocytopenic purpura

**Palavras-chave em inglês:**

Purpura, Thrombocytopenic, Idiopathic

Gene polymorphism

Interleukins

Adult

Keyword

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestra em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Marcelo Addas de Carvalho [Orientador]

Vânia Maris Morelli

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

**Data da defesa:** 29-08-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

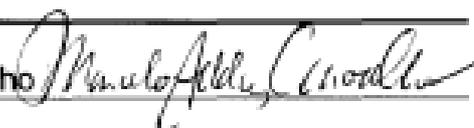
Josie Fadul Vilela

---

---

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Addas Carvalho

---



---

### Membros:

---

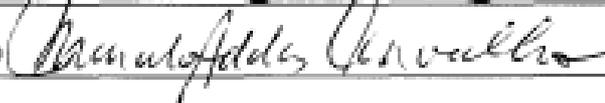
1. Profa. Dra. Vânia Maris Morelli



2. Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi



3. Prof. Dr. Marcelo Addas Carvalho



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 29/08/2012

---

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese aos meus pais, Eneida e Luiz, que iluminaram meus caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu pudesse trilhar sem medo e com esperança e à minhas irmãs, Érica, Ariane e Eduarda pelo carinho e amizade.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram deste estudo, em especial ao meu orientador Dr. Marcelo Addas pelas críticas, sugestões e confiança no meu trabalho; à Dra Joyce pelo apoio e inspiração;

Agradeço ao Andrey e à Ucha pelas sugestões e o grande auxílio nas padronizações das técnicas de biologia molecular;

Agradeço aos funcionários do SAM e aos pacientes que aceitaram a participar deste estudo;

Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. “Chico Xavier”

“O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.  
O que for o teu desejo, assim será tua vontade.  
O que for a tua vontade, assim serão teus atos.  
O que forem teus atos, assim será teu destino. “

**-Brihadaranyaka Upanishad IV, 4.5**

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
Púrpura Trombocitopênica Imune: definição e epidemiologia .....	27
Fisiopatologia da PTI .....	28
Citocinas .....	32
Polimorfismos das Interleucinas .....	34
Formas terapêuticas .....	35
OBJETIVOS.....	39
JUSTIFICATIVA DO ESTUDO .....	41
MATERIAL E MÉTODOS .....	47
Pacientes e grupo controle .....	49
Estudo do polimorfismo gênico.....	49
Extração de DNA de sangue periférico.....	49
Identificação dos polimorfismos.....	51
- Polimorfismo do gene <i>IL1B</i> -511C/T .....	51
- Polimorfismo do gene <i>IL1B</i> +3953C/T .....	51
- Polimorfismo do gene <i>IL1RN</i> intron 2 VNTR .....	52
- Polimorfismo do gene <i>IL4</i> -590C/T .....	52
- Polimorfismo do gene <i>IL4</i> intron 3, VNTR .....	53
- Polimorfismo do gene <i>IL6</i> -174G/C .....	53
- Polimorfismo do gene <i>IL10</i> -1082 A/G.....	54
- Polimorfismo do gene <i>IL10</i> -592 A/C.....	54
- Polimorfismo do gene <i>IL10</i> - 819G/A.....	55
Obtenção dos dados clínicos.....	55
Métodos estatísticos .....	56
RESULTADOS Análise dos Dados Clínicos .....	57
Análise de polimorfismos .....	60
- Polimorfismos do complexo do gene <i>IL1B</i> .....	61
- Polimorfismos do gene <i>IL4</i> .....	62
- Polimorfismo do gene <i>IL6</i> .....	63
- Polimorfismos do gene <i>IL10</i> e estudo dos seus haplótipos.....	64
- Haplótipos de <i>IL10</i> ( -1082GA; -819CT; -592AC) .....	66

Análise de polimorfismos associados à resposta clínica .....	66
Contagem de plaquetas ao diagnóstico e polimorfismos.....	68
DISCUSSÃO.....	85
Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	98
Contagem de plaquetas e polimorfismo gênico .....	99
Resposta à terapêutica.....	100
CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS .....	107
ANEXOS.....	117

# LISTA DE ABREVIATURAS

APC- célula apresentadora de antígenos

BE- brometo de etídio

CD154- *cluster of differentiation 154*

CD2- *cluster of differentiation 2*

CD28- *cluster of differentiation 28*

CD40- *cluster of differentiation 40*

CD80- *cluster of differentiation 80*

CTL- linfócito T citotóxico

EDTA- sal dissódico do ácido etilenodinitritetracético

EHW- equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Fc- fragmento cristalizável das imunoglobulinas (Ig)

GP- glicoproteína

HCl- ácido clorídrico

ICAM-1- *intercellular adhesion molecule 1*

*IL1*- gene codificador da interleucina-1

IL-1- interleucina-1

*IL10*- gene codificador da interleucina-10

IL-10- interleucina-10

IL1-Ra- antagonista do receptor da interleucina-1

IL1RN- gene codificador do antagonista do receptor da interleucina-1

IL1- $\alpha$ - interleucina-1 alfa

IL1- $\beta$ - interleucina-1 beta

*IL4*- gene codificador da interleucina-4

IL-4- interleucina-4

*IL6*- gene codificador da interleucina-6

IL-6- interleucina-6

KCl- cloreto de potássio

LFA-1- *lymphocyte function-associated antigen-1* ( antígeno associado à função do leucócito-1)

LFA-3- *lymphocyte function-associated antigen-3* ( antígeno associado à função do leucócito-3)

MgCl<sub>2</sub>- cloreto de magnésio

MHC- *major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

NH<sub>4</sub>Cl- cloreto de amônio

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>- bicarbonato de amônio

PCR- *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

RFLP- restriction fragment length polymorphism

RT-PCR- *Real-Time PCR* (PRC em tempo real)

SDS- *sodium lauryl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SNP- *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de base única)

TCR- receptor de células T

Th1- linfócitos T *helper* tipo 1

Th2- linfócitos T *helper* tipo 2

VNTR- *variable number of tandem repeats* (número variável de repetições em tandem)

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação simplificada da fisiopatologia da PTI.....	31
<b>Figura 2:</b> Géis de eletroforese evidenciando os padrões polimórficos dos genes estudados.....	69
<b>Figura 3:</b> Padrões polimórficos de <i>IL10</i> -819C/T evidenciados por Real-Time PCR (RT-PCR).....	70

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Pacientes do estudo agrupados de acordo com sexo, PTI primária ou PTI secundária.....	71
<b>Tabela 2:</b> Frequência dos genótipos dos polimorfismos <i>IL1B</i> -511C/T; <i>IL1B</i> +3953C/T; <i>IL1RN</i> intron 2 VNTR; <i>IL4</i> -590C/T; <i>IL4</i> intron 3 VNTR; <i>IL6</i> -174G/T; <i>IL10</i> -1082G/A; <i>IL10</i> -819C/T; <i>IL10</i> -592A/C e haplótipos de <i>IL10</i> em pacientes e controles.....	73
<b>Tabela 3:</b> Frequência dos alelos dos polimorfismos <i>IL1B</i> -511C/T; <i>IL1B</i> +3953C/T; <i>IL1RN</i> intron 2 VNTR; <i>IL4</i> -590C/T; <i>IL4</i> intron 3 VNTR; <i>IL6</i> -174G/T; <i>IL10</i> -1082G/A; <i>IL10</i> -819C/T; <i>IL10</i> -592A/C em pacientes e controles.....	81
<b>Tabela 4:</b> Polimorfismo do gene <i>IL1B</i> -511C/T associado com a resposta a esplenectomia.....	84

## RESUMO

A Púrpura Trombocitopênica Imune (PTI) é uma doença autoimune caracterizada pela presença de autoanticorpos contra as glicoproteínas de membrana plaquetária, tais como GPIIb/IIIa e GPIb/IX. O processo patogênico da PTI envolve uma destruição acelerada das plaquetas pelo sistema retículo-endotelial e a presença de sangramentos mucocutâneos. A reação inflamatória em doenças infecciosas e autoimune é regulada por um balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias e a PTI tem sido associada com a desregulação das respostas e atividades de citocinas. Uma associação entre os polimorfismos de genes de citocinas que afetam sua produção e secreção foram relatadas em doenças infecciosas, alérgicas, autoimunes, e malignas, tanto na fase de formação quanto no decurso da doença e nas suas respostas ao tratamento. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a importância dos polimorfismos *IL1B* -511C/T, *IL1B* +3953C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL4* -590C/T, *IL4* intron 3 VNTR, *IL6* -174G/C, *IL10* -1082G/A, *IL10* -819C/T e *IL10* -592 A/C em pacientes portadores de PTI na região de Campinas, SP e investigar a associação entre os genótipos identificados e a resposta clínica do paciente ao tratamento. Utilizamos o método PCR e digestão com enzima de restrição (PCR-RFLP) ou PCR em Tempo real (RT-PCR) para identificação dos polimorfismos. No total, 216 pacientes adultos diagnosticados com PTI foram pareados com 119 controles saudáveis constituídos por doadores voluntários do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP. Os dados clínicos como contagem de plaquetas ao diagnóstico, tipo de tratamento e resposta, foram obtidos através dos prontuários médicos. A análise de frequências dos alelos e genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T, *IL1B* +3953C/T, *IL6* -174G/C, *IL10*-1082G/A, *IL10* -819C/T e *IL10* -592A/C de pacientes portadores de PTI comparadas ao grupo controle não mostrou

diferenças significativas entre os dois grupos. No entanto, para os polimorfismos *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL4* -590C/T, *IL4* intron 3 VNTR e para os haplótipos de *IL10* houve uma diferença significativa ao compararmos as frequências polimórficas entre os dois grupos. Analisando-se os polimorfismos associados com parâmetros clínicos, este estudo mostrou que o genótipo *IL1B* -511CC estava mais presente em indivíduos com boa resposta à esplenectomia. Pode-se concluir que o estudo de características genéticas dos pacientes portadores de PTI na região de Campinas, SP pode ajudar a esclarecer o perfil de pacientes acometidos pela doença nesta região, identificando grupos de maior risco e a entender qual polimorfismo pode estar associado a uma melhor resposta clínica, projetando uma nova linha de investigação.

# ABSTRACT

The immune thrombocytopenic purpura (ITP) is an autoimmune disease characterized by the presence of autoantibodies against the platelet membrane glycoproteins such as GPIIb/IIIa and GPIb/IX. The pathogenic process of ITP involves an accelerated destruction of platelets by reticuloendothelial system and the presence of mucocutaneous bleeding. The inflammatory reaction in infectious and autoimmune diseases is regulated by a balance between pro and anti-inflammatory cytokines and ITP has been associated with dysregulation of cytokine responses and activities. An association between cytokine gene polymorphisms that affect their production and secretion have been reported in infectious, allergic, autoimmune, and malignant diseases, both during training and during the illness and its response to treatment. The aim of this study was to evaluate the importance of *IL1B* -511C/T, *IL1B* +3953 C/T, *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL4* -590C/T *IL4* intron 3 VNTR, *IL6* -174G/C, *IL10* -1082G/A, *IL10* -819C/T and *IL10* -592A/C polymorphisms in patients with ITP in the region of Campinas, SP, and investigate the association between different genotypes and clinical responses to treatment. We used the PCR method and digestion with restriction enzyme (PCR-RFLP) or real-time PCR (RT-PCR) to identify polymorphisms. In total, 216 adult patients diagnosed with ITP were matched with 118 healthy controls. The clinical data such as platelet count at diagnosis, type of treatment and response were obtained from medical records. Analysis of allele and genotypes frequencies of *IL1B* -511C/T, *IL1B* +3953C/T, *IL6* -174G/C, *IL10* -1082G/A, *IL10* -819C/T and *IL10* -592A/C polymorphisms in patients with ITP compared to the control group showed no significant differences between the two groups. However, for *IL1RN* intron 2 VNTR polymorphisms, *IL4* -590C/T, *IL4* intron 3 VNTR and *IL10* haplotypes there were a significant difference when comparing

polymorphic frequencies between the two groups. Analyzing the polymorphisms associated with clinical parameters, this study showed that *IL1B* -511CC genotype was more frequent in individuals with good response to splenectomy. It can be concluded that the study of genetic characteristics of patients with ITP in the region of Campinas, SP should help clarify the profile of patients affected, identifying groups at higher risk and understanding which polymorphism may be associated with better clinical response.

# **INTRODUÇÃO**

## **Púrpura Trombocitopênica Imune: definição e epidemiologia**

A Púrpura Trombocitopênica Imune (PTI) é uma doença imunomediada em que as plaquetas são opsonizadas por autoanticorpos e destruídas prematuramente por células fagocíticas no sistema retículo-endotelial. A trombocitopenia observada em PTI é primariamente o resultado de um sequestro aumentado de plaquetas pelo baço e fígado (Semple, 2002) e embora as anormalidades humorais sejam bem definidas, as células T desempenham um importante papel no início da doença (Semple, 1998; Semple e Freedman, 1995).

As duas formas da doença, aguda e crônica, diferem no fato de que a forma aguda é geralmente precedida por um evento infeccioso e normalmente entra em remissão espontaneamente após algumas semanas. É a forma mais comum em crianças. Já a forma crônica é definida por uma trombocitopenia persistente por mais de 6 meses, geralmente ocorre em adultos e é classificada como uma doença autoimune órgão-específica primariamente mediada por autoanticorpos IgG. A contagem de plaquetas para os casos crônicos geralmente permanecem de um terço à metade do valor normal de  $150.000/\text{mm}^3$  na maioria dos pacientes, mas pode cair a níveis abaixo de  $20.000/\text{mm}^3$  e estar associada a sangramentos mucocutâneos (Godeau et al., 2007) .

O diagnóstico para PTI é feito por exclusão e por meio de informações clínicas. Os dados relativos a sua incidência e prevalência são limitados, a metodologia utilizada para determiná-las são variáveis e em sua maior parte resultam de análises da população européia e norte americana (Fogarty, 2009). Dados de estudos epidemiológicos internacionais em adultos fornecem uma estimativa de incidência de 1,6-2,7 casos por 100.000 pessoas/ano e uma prevalência de 9,5-23,6 casos por 100.000 pessoas, com predominância no sexo

feminino (Abrahamson et al., 2009). Não há dados oficiais a respeito de sua incidência e prevalência na população brasileira.

### **Fisiopatologia da PTI**

Uma doença autoimune, em princípio, ocorre devido à falha em eliminar ou desativar linfócitos autoreativos refletindo uma deficiência na indução dos mecanismos de tolerância imunológica. A tolerância imunológica, se caracteriza pela capacidade dos elementos do sistema imune reagirem contra uma enorme variedade de micro-organismos, mas não contra antígenos próprios. Neste processo os linfócitos potencialmente autoreativos são eliminados (deleção clonal) ou tornados afuncionais (anergia clonal) após contato com os autoantígenos. Dois tipos de tolerância são descritos: a Tolerância Central, que é induzida quando os linfócitos em desenvolvimento encontram os antígenos próprios nos órgãos geradores, e a Tolerância Periférica que é induzida quando os linfócitos maduros encontram os antígenos próprios nos órgãos periféricos. No caso de células T, aquelas que são capazes de reconhecer peptídeos próprios normais e estimular uma resposta de autoanticorpos são deletadas no timo durante sua ontogenia por um processo de seleção negativa. Entretanto se esta seleção falha e a célula não sofre apoptose no timo, ela ainda pode ser detectada nos tecidos periféricos e ser inativada por um mecanismo pós-tímico de tolerância periférica (Lo et al., 1991). Mecanismos de tolerância também ocorrem e são importantes em células B, pois são elas as produtoras de anticorpos. Mecanismos de tolerância central inibem a expansão da população de células B autoreativas e, igualmente ao que ocorre em células T, mecanismos periféricos também podem ser ativados.

No processo de reconhecimento de antígeno próprio, no caso da autoimunidade, podem ocorrer mecanismos conhecidos como mimetismo molecular e reação cruzada. O mimetismo molecular é definido como estruturas similares produzidas por genes não similares. Por um mecanismo complementar o microorganismo pode induzir o injúrio celular e livrar seus próprios antígenos, ou seja, anticorpos vírus-específicos da infecção reagem cruzadamente com o antígeno próprio normal. Muitas vezes a indução da reação cruzada não requer um agente persistente e um injúrio autoimune pode ocorrer depois que o imunogênico foi removido. Sendo assim, uma infecção viral pode ser vista como um evento gatilho, mas ela pode ser assintomática (Zhou et al., 2005).

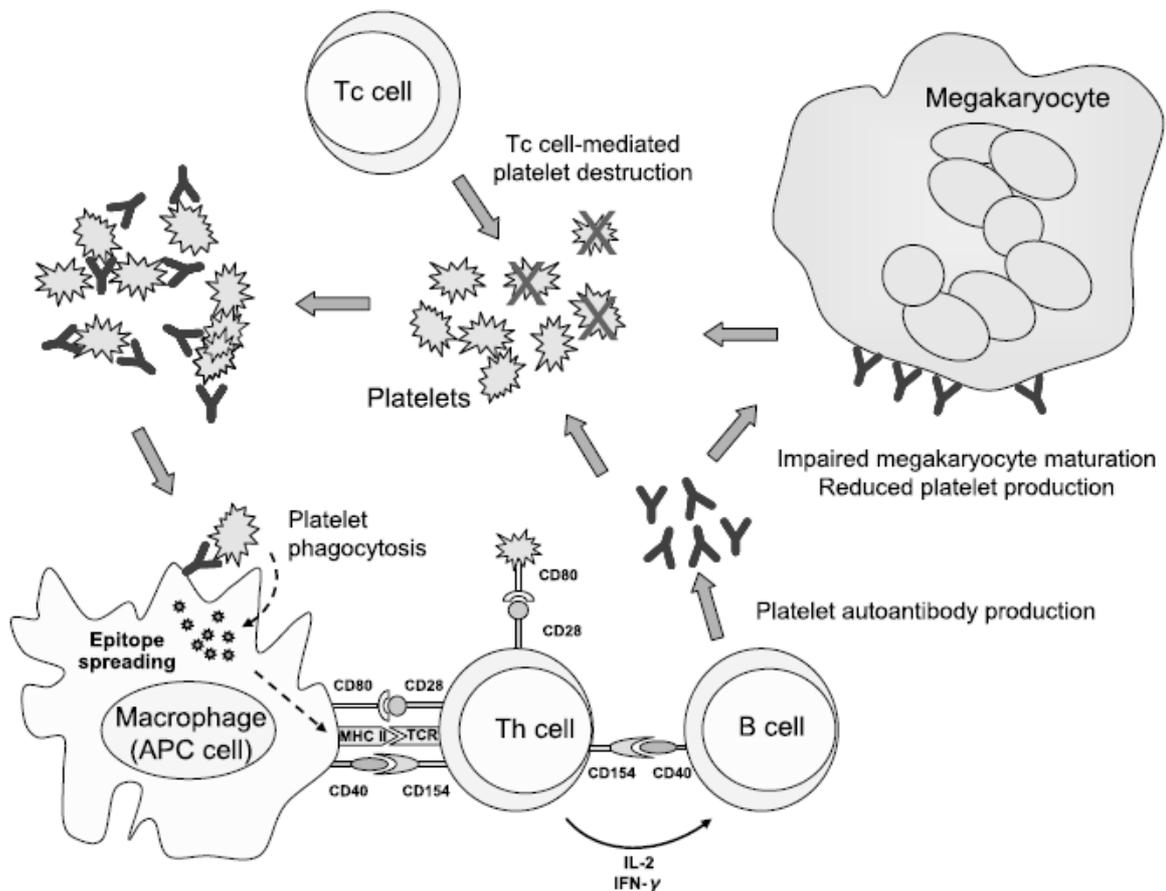
Outro mecanismo de reconhecimento do próprio antígeno é pela presença de epítopos crípticos. Por razões enzimáticas, bioquímicas e funcionais, apesar do timo apresentar a maioria dos antígenos próprios para tolerização, ele não apresenta todos os antígenos próprios e não apresenta todos os epítopos de cada antígeno. Estes epítopos não apresentáveis são denominados epítopos crípticos e esta é uma situação potencialmente perigosa, pois permite a geração de linfócitos T autorreativos funcionais. Nestes casos, mecanismos evitam o desenvolvimento de autoimunidade. No caso dos epítopos crípticos, a suposição é que o mesmo processo que impede sua apresentação no timo impedirá sua apresentação na periferia, de modo que eles são incapazes de dar início a uma resposta imune (Zhou et al., 2005).

Alguns epítopos crípticos que normalmente não são expressos e expostos na sua forma nativa, podem se tornar expostos e reconhecidos pelo sistema imune sob certas circunstâncias, como por exemplo uma infecção. Durante a infecção, o processamento desses autoantígenos engolfados nas células apresentadoras de

antígenos (APCs) dão origem a um número de novos epítomos e este processo de neoantigênese pode perpetuar ou exacerbar a resposta inflamatória. As células T que reagem com epítomos crípticos podem escapar da seleção negativa do timo e quando esses epítomos são expostos a uma resposta autoimune, a ativação das células T programam uma cascata inflamatória que pode lesar o tecido.

No caso da PTI, o mecanismo primário para perda de tolerância é, muitas vezes, desconhecido. Entretanto a emergência de autoanticorpos antiplaquetários se mantém como principal mecanismo da patogenia. As glicoproteínas da superfície plaquetária, mais precisamente GPIIb/IIIa e Ib/IX, são reconhecidas pelos autoanticorpos, revestidas por eles e ligadas às células apresentadoras de antígenos (APCs) – macrófagos ou células dendríticas – por meio de receptores Fc-gama (Fc $\gamma$ ). As células apresentadoras de antígenos não apenas degradam as glicoproteínas, mas também amplificam a resposta imune inicial gerando epítomos ocultos a partir de outras glicoproteínas plaquetárias, num processo conhecido como *epitope spreading*. As APCs ativadas expressam esses novos peptídeos na sua superfície e, com a ajuda da interação da proteína CD154 expressa em células T ativadas e seu receptor CD40, iniciam a proliferação de clones de células T CD4-positivas. Um sinal adicional coestimulador deve ocorrer e desta maneira, as células T helper ativadas produzem citocinas (interleucina-2 e interferon- $\gamma$ ) que promovem a diferenciação de células B e produção de autoanticorpos. Os autoanticorpos, por sua vez, também podem se ligar aos megacariócitos da medula óssea comprometendo a maturação dos mesmos e a produção plaquetária (Cines e Blanchette, 2002; Nugent, 2002; Semple, 2002; Stasi et al., 2008). Este processo fisiopatológico é demonstrado na figura 1.

Um caminho alternativo de destruição plaquetária seria mediado por células T citotóxicas autorreativas. Embora seu mecanismo *in vivo* não seja bem conhecido, um estudo envolvendo expressão de genes da família *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR) demonstrou uma alta expressão dessa família de genes em pacientes com PTI em remissão. É sabido que KIRs regulam as respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL) e células *Natural Killers* (NK) pela sua ligação às moléculas de MHC de classe I e assim, previnem a lise de células alvo. Este estudo sugere que a lise de plaquetas mediada por CTLs pode estar envolvida na patogênese da PTI (Olsson et al., 2003). Sendo assim, é sugerido que a Púrpura Trombocitopênica Imune é uma doença heterogênea e diferentes mecanismos podem estar envolvidos, incluindo fagocitose por macrófagos, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos e destruição mediada por CTLs.



ativação e fase efetora de células T, células B e macrófagos. A ativação ótima das

células T requer dois sinais, o primeiro é baseado no reconhecimento do complexo peptídeo-MHC pelos receptores de célula T (TCR), o segundo pela interação de co-receptores estimuladores como CD28 (Cluster of Differentiation 28), CD2 (Cluster of Differentiation 2) e LFA-1(Lymphocyte Function-associated Antigen-1) em células T com seus respectivos ligantes CD80 (B7-1), LFA-3 (Lymphocyte Function-associated Antigen-3) e ICAM-1(Intercellular Adhesion Molecule 1) nas APCs. Isto ocorre para que uma resposta eficaz seja induzida e a ligação de células T com as APCs permaneçam estáveis durante um período de tempo suficientemente longo para que o limiar de sinalização necessário seja alcançado.

As células Th ativadas, como já dito, produzem citocinas que por sua vez promovem diferenciação de células B e produção de anticorpos. A interação contínua entre células B e T através de CD40- CD40L (CD154) é necessária para manter ativa a autoimunidade plaquetária (Stasi et al., 2008). Plaquetas por si mesmas expressam CD154 e normalmente o nível em sua superfície é baixo com a ocorrência de um aumento após ativação plaquetária. Quantidades aumentadas de CD154 e seu RNA mensageiro foram encontrados em plaquetas e megacariócitos de pacientes portadores de PTI, e eles foram capazes de direcionar a ativação de linfócitos B autoreativos. Isto sugere a possibilidade das plaquetas desempenharem um papel no processo autoimune (Sood et al., 2006).

Finalmente, um aumento da expressão de CD80 (B7-1) em plaquetas de pacientes portadores de PTI foi observado explicitando o papel da co-estimulação CD80/CD28 na patogênese desta doença (Semple e Freedman, 1991).

## **Citocinas**

Na resposta a uma lesão, há uma série de mediadores locais protéicos ou glicoprotéicos que determinam os tipos de células a serem recrutadas. Esses

mediadores são conhecidos como citocinas e elas são capazes de modular o estado de ativação de células inflamatórias e participar da comunicação celular entre células imunocompetentes. Elas incluem as interleucinas (IL), interferons (IFN) e fatores de necrose tumoral (TNF).

Uma expressão inapropriada delas é um achado comum em lesões autoimunes, pois estão intimamente envolvidas em cada estágio do processo de autoimunidade recrutando células inflamatórias por quimiotaxia. Considerando que algumas citocinas podem induzir uma expressão aumentada de moléculas de MHC em células alvo, foi sugerido que podem aumentar a citotoxicidade de células T, facilitando a perda de auto tolerância e então levar a ativação de linfócitos T autoreativos (Feldman, 1993). Padrões de secreção de citocinas determinados geneticamente podem contribuir para suscetibilidade à doenças autoimunes e numerosos estudos reportam padrões anormais de expressão de citocinas em várias condições autoimunes incluindo Artrite Reumatóide (AR), Esclerose Múltipla e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (De Carli M, 1994).

As citocinas podem também determinar o desenvolvimento local de células T CD4+ específicas que também liberam citocinas específicas. Os linfócitos T helper CD4+ podem ser agrupados em 3 subconjuntos funcionais (Th1, Th2 e Th0) dependendo do perfil da citocina que ele produz. Células Th1 produzem IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$  e IL-12, enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Mosmann TR, 1989). Citocinas liberadas por linfócitos Th1 e Th2 exibem um antagonismo mútuo. Produtos de Th1 aumentam a atividade microbicida, enquanto que os de Th2 agem no desenvolvimento de células B e sua maturação para produção de anticorpos.

Qualquer desbalanço no equilíbrio existente entre as respostas de Th1 e Th2 pode favorecer o desenvolvimento de reações imunes anormais, incluindo doenças autoimunes. Uma relação elevada Th1/Th2 foi reportada em pacientes com PTI crônica (Ogawara et al., 2003) e ela tem sido associada com respostas e desregulações das atividades das citocinas (Semple, 2002).

### **Polimorfismos das Interleucinas**

Os níveis de citocina basal são variáveis entre os indivíduos e influências genéticas e ambientais desempenham um papel importante nesta variação. Dentre as variações genéticas, os polimorfismos localizados em de regiões codificadoras e não codificadoras dos genes das citocinas tem sido investigados e sua associação com doenças têm sido propostas (Smith e Humphries, 2009).

O interesse científico em estudar os polimorfismos dos genes codificadores das interleucinas visa o entendimento de como eles afetam o controle destes genes e como estão distribuídos na população alvo do estudo. Os polimorfismos podem ser de 3 formas principais: o Polimorfismos de Base Única (SNPs), o de número variável de repetições em tandem (VNTR) e os microsatélites. Alguns desses polimorfismos levam à substituição de um aminoácido na cadeia protéica, porém a maioria, no caso das citocinas, encontram-se na região promotora do gene, na região intrônica ou na região 3', ou seja, em regiões não traduzidas mas que podem influenciar a expressão e/ou função do gene. Dentro dos polimorfismos investigados estão os polimorfismos das interleucinas, que podem estar envolvidos na regulação dos níveis basais destas proteínas e então modular a resposta inflamatória.

É importante destacar o papel da família de genes da interleucina-1(IL-1), que compreendem a IL1- $\alpha$  (interleucina-1 alpha), IL1- $\beta$  (interleucina-1 beta) e IL1-Ra (antagonista do receptor da interleucina-1). Sua ação mais importante na inflamação

se deve aos efeitos no endotélio, leucócitos e fibroblastos, bem como a indução das reações da fase aguda (Smith e Humphries, 2009). Polimorfismos desta interleucina foram associados com susceptibilidade a doenças como nefropatite (Gorgi Y, 2010) e mieloma múltiplo (Vangsted AJ, 2012).

A interleucina-4 (IL-4) exerce importantes ações sobre diversos tipos celulares e dentre suas características está a atuação como fator de crescimento e diferenciação das células B. Seus polimorfismos foram relacionados a poliartrite crônica (Buchs et al., 2000) e Lúpus Sistêmico Eritematoso (LES) (Wu MC et al., 2003).

Já a interleucina-6 (IL-6) é uma importante mediadora de resposta a fase aguda de uma infecção e sua forma polimórfica foi associada ao crescimento de linfócitos B leucêmico e linfomas de célula T. (Cotran et al., 1999). Seus polimorfismos foram estudados e relacionados a doenças como artrite reumatóide (Lee YH BS, Choi SJ, Ji JD, Song GG., 2012) e doença coronariana (Zheng GH, 2012).

Ainda, a interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória, é produzida nos linfócitos B e nos T “*helper*” tipo 2 (Th2) e nos monócitos. Possui uma função inibitória da proliferação dos linfócitos T “*helper*” tipo 1 (Th1) e da produção de interferon-gama (INF- $\gamma$ ) e IL-2, bem como apresenta ação inibitória de interleucinas próinflamatórias como IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e da quimiocina MIP-1 $\alpha$ . Ela apresenta alguns polimorfismos importantes com formação de haplótipos e associação com doenças como câncer gástrico (Zhuang W, 2010) e doença de enxerto contra o hospedeiro (DECH) (Socie et al., 2001).

## **Formas terapêuticas**

A terapêutica atualmente proposta para PTI pode abranger a intervenção na síntese de anticorpos e nos mecanismos de produção, sensibilização e eliminação das plaquetas do organismo. A conduta inicial consiste no uso de corticosteróides como prednisona que por sua ação imunossupressora tende a diminuir a mobilidade e atividade dos macrófagos reduzindo seus receptores Fc, diminuir a secreção de citocinas, inibir a ação de linfócitos e reduzir sua replicação clonal e também diminuição da produção de anticorpos. Contudo, se a terapêutica inicial, for caracterizada por sua falência ou dependência, a esplenectomia se torna a segunda opção (Cines e Blanchette, 2002).

Os benefícios cirúrgicos da esplenectomia em pacientes com PTI refletem um efeito duplo, pois elimina a fonte de síntese de anticorpos antiplaquetários bem como o sítio primário de destruição plaquetária (Zhou et al., 2005). Outras alternativas terapêuticas utilizadas no tratamento de pacientes portadores de PTI incluem a Azatioprina que é um agente imunossupressor citotóxico, o Rituximab caracterizado por ser um anticorpo monoclonal, agindo contra células B circulantes e também o uso de imunoglobulina endovenosa, em que a imunoglobulina bloqueia o receptor Fc das células fagocíticas do baço, ocorrendo então uma menor destruição de plaquetas opsonizadas.

A resposta ao tratamento pode ser classificada como completa, parcial, ou ausente, dependendo do nível de plaquetas alcançado. A maioria dos autores define a resposta como completa quando o número de plaquetas se normaliza, ultrapassando 150.000/mL; a resposta é parcial quando a contagem situa-se entre 50.000 e 100.000/mL e a resposta é ausente quando a contagem de plaquetas não chega a 50.000/mL (Stevens et al., 2006).

Os pacientes portadores de PTI na maioria das vezes respondem diferentemente aos diversos tipos de fármacos. Ainda hoje, é difícil individualizar um tratamento e a conduta terapêutica é baseada no grau de sangramento individual do paciente e resposta prévia ao tratamento. Não são conhecidos motivos que justificam casos de falha terapêutica ou refratariedade. Dessa maneira, estudos envolvendo resposta clínica e elementos de controle do processo inflamatório, como por exemplo as citocinas e os polimorfismos que regulam sua produção, podem colaborar para melhor entendimento das diferentes respostas ao tratamento e também entendimento do perfil genético dos pacientes acometidos pela doença.

## **OBJETIVOS**

Os objetivos deste estudo foram:

1. Determinar a frequência dos polimorfismos *IL1B*-511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T e *IL10* -592C/A em indivíduos com diagnóstico de PTI comparando com a frequência em uma população da região de Campinas no sudeste do estado de São Paulo;
2. Avaliar a resposta a tratamentos imunossupressores (por exemplo: corticoterapia e esplenectomia) e a relação com os polimorfismos estudados.

## **JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

O presente estudo tem relevância, pois avalia e caracteriza os polimorfismos que interferem na transcrição do gene de citocinas envolvidas com a resposta inflamatória e a ocorrência da PTI na população da região de Campinas no estado de São Paulo, comparando com relatos na literatura internacional.

A avaliação da resposta ao tratamento com a frequência destes polimorfismos tenta identificar fatores de prognósticos para os mais utilizados tipos de terapêutica, já que ainda não são bem conhecidas as razões pelas quais esta resposta é variável entre os indivíduos acometidos por PTI.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **Pacientes e grupo controle**

Foram estudados 216 pacientes adultos (acima de 14 anos) atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia – Hemocentro da UNICAMP (Campinas, SP) com diagnóstico de Púrpura Trombocitopênica Imunológica (PTI).

O grupo controle foi constituído por doadores de sangue voluntários, também do Centro de Hematologia e Hemoterapia – Hemocentro da UNICAMP (Campinas, SP) sendo que 100 doadores foram caucasóides não relacionados e 19 foram negróides, ambos estudados para os polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T e *IL10* -592C/A.

A coleta de amostras para extração de DNA e genotipagem dos grupos foi autorizada após assinatura dos participantes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, parecer N° 083/2008 (Anexo 2).

## **Estudo do polimorfismo gênico**

### **Extração de DNA de sangue periférico**

O DNA foi extraído de 8 ml de sangue coletado com EDTA. Após centrifugação por 15 minutos a 3.500 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Ao precipitado foram adicionados 5 volumes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  144mM e ½ volume de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10mM, sendo misturado por inversão, para lise das hemácias. As amostras foram centrifugadas a 2.200 rpm durante 20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o procedimento foi repetido.

O sobrenadante foi descartado e ao sedimento obtido adicionou-se 5mL de tampão TKM1 (Tris-HCl 10mM, pH 7,6 KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 0,2mM) e 125µL de Triton X10 (Sigma Chemical, CO, Steinheim, Alemanha). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 5mL TKM1 e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspenso com 400µL de TKM2 (NaCl 400mM, KCl 10mM, pH 7.6 MgCl<sub>2</sub> 10mM) e 25µL de SDS 10 (dodecil sulfato de sódio), para a lise dos leucócitos. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante 30 minutos. Após este período, foram acrescentados 180µL de NaCl 5M e homogeneizados com a própria ponteira. Esperou-se o tempo de 20 minutos em temperatura ambiente com a finalidade de precipitar as proteínas. Após este tempo, centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga.

O sobrenadante contendo o DNA foi submetido à extração através da adição de 450µL de clorofórmio/álcool isoamílico e 450µL de fenol bidestilado saturado com Tris-HCl pH 8.0, seguida de centrifugação à 12000 rpm por 5 minutos. Este processo foi repetido após a adição de 1mL de clorofórmio/álcool-isoamílico. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de fundo cônico de 1500µL. Acrescentou-se 10% do volume do sobrenadante com acetato de sódio 3M pH 5.2 e 1mL de etanol absoluto gelado, e agitou-se por inversão para precipitação do DNA.

Em seguida, centrifugou-se por 3 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 70% gelado, e uma nova centrifugação foi realizada. Descartou-se o sobrenadante e o DNA precipitado permaneceu em temperatura ambiente para secar. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em aproximadamente 300µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 7.5 EDTA 1mM) que permaneceu durante 16 horas sob refrigeração (4°C) para sua total dissolução.

## Identificação dos polimorfismos

Os métodos utilizados para identificação dos polimorfismos após a extração do DNA genômico dos pacientes são descritos abaixo.

### - Polimorfismo do gene *IL1B* -511C/T

Realizou-se a amplificação da região promotora deste gene pela técnica de PCR utilizando o protocolo constituído por desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto finalizando com uma incubação a 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C. Para isto foi utilizado o seguinte par de iniciadores: 5'- **TGGCATTGATCTGGTTCATC** – 3' e 5'- **GTTTAGGAATCTTCCCACTT** – 3'. O produto final da amplificação foi então digerido com a enzima de restrição **Ava I** a 37°C *overnight*.

Os fragmentos resultantes foram visualizados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio (BE) (Bioque et al., 1995; Hurme e Santtila, 1998) e dois padrões puderam ser evidenciados: fragmentos de 190 pb e 115 pb correspondendo ao alelo -511C ou um único fragmento de 305 pb correspondendo ao alelo -511T.

### - Polimorfismo do gene *IL1B* +3953C/T

O método de PCR foi utilizado para amplificação da região onde se encontra o polimorfismo do gene da IL-1 $\beta$  na posição +3953, no exon 5. O protocolo foi constituído por desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto finalizando com uma incubação a 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C. Para isto foi utilizado o seguinte par de iniciadores: 5' -**GTTGTCATCAGACTTTGACC** – 3' e 5' -

**TTCAGTTCATATGGACCAGA – 3’**. O produto final da amplificação foi então digerido com a enzima de restrição **Taq I** a 65°C *overnight*.

Os fragmentos resultantes da digestão foram visualizados em gel de agarose a 3% com BE, onde dois padrões serão evidenciados: fragmentos de 136 pb e 114 pb correspondendo ao alelo +3953C ou único fragmento de 250 pb correspondendo ao alelo +3953T (Bioque et al., 1995; Hurme e Santtila, 1998).

#### - Polimorfismo do gene *IL1RN* intron 2 VNTR

A região do intron 2 do gene *IL1RN* foi amplificada utilizando o protocolo seguinte. Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um período de extensão a 72°C por 7 minutos. Para isto foi utilizado o seguinte par de iniciadores: **5’- CTCAGCAACACTCCTAT –3’** e **5’- TCCTGGTCTGCAGGTAA – 3’**. O produto da amplificação foi evidenciado em gel de agarose a 3% com BE apresentando 6 padrões: alelo 0 (um fragmento de repetição) com 154 bp, alelo 1 (4 repetições) com 410 pb, alelo 2 (duas repetições) com 240 bp, alelo 3 (cinco repetições) com 500 bp, alelo 4 (3 repetições) com 325 bp e alelo 5 (6 repetições) com 595 bp (Tarlow et al., 1993; Vamvakopoulos, 2002).

#### - Polimorfismo do gene *IL4* –590C/T

A região promotora do gene *IL4* possui polimorfismo com troca de uma base nitrogenada (C → T). Este polimorfismo foi estudado por reação de PCR utilizando como iniciadores: **5’-TAAACTTGGGAGAACATGGTC-3’** e **5’- TGGGGAAAGATAGAGTAATA-3’**. A base original na posição –594 é T, mas foi

substituído no desenho do iniciador por G para criar-se um sítio de restrição para enzima **Ava II**. O protocolo utilizado para amplificação do fragmento foi desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, finalmente período de extensão de 7 minutos a 72°C e resfriamento a 4°C. O produto amplificado foi digerido com a enzima **Ava II** a 37°C *overnight* e então identificado em gel de agarose 3% com BE onde dois alelos foram evidenciados: alelo -590C com fragmentos de 177 bp e 18 bp e alelo 590T com um único fragmento de 195 bp (Scarel-Caminaga et al., 2003).

#### - Polimorfismo do gene *IL4* intron 3, VNTR

A região intrônica 3 do gene *IL4* possui polimorfismo relacionado a repetição de uma seqüência de 70 pb. Este polimorfismo foi estudado por reação de PCR utilizando como iniciadores: **5'-TAGGCTGAAAGGGGGAAAGC-3'** e **5'-CTGTTACCTCAACTGCTCC-3'**. O protocolo utilizado para amplificação do fragmento foi denaturação inicial 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 63°C e 1 minuto a 72°C e finalmente período de extensão de 7 minutos a 72°C. O produto amplificado foi diretamente identificado em gel de agarose a 3% com BE onde foram identificados três alelos denominados: alelo 1 com 3 repetições (254 bp) e alelo 2 com 2 repetições (184 bp) e alelo 3 com ausência de repetição (114 pb) (Hegab et al., 2004)..

#### - Polimorfismo do gene *IL6* -174G/C

Realizou-se a amplificação do fragmento da região promotora do gene utilizando os iniciadores **5'-ACTTCGTGCATGACTTCA-3'** e **5'-**

**TTCATAGCTGGGCTCCTG -3'** de acordo com o seguinte protocolo: denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos por denaturação a 95°C, anelamento a 63°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto do PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição **Nla III** a 37°C *overnight* e sua digestão evidenciada em gel de agarose 3% com BE. Pôde-se então identificar a presença de dois alelos: um fragmento de 210 bp correspondente ao o alelo -174G e dois fragmentos de 125 e 85 bp correspondendo ao alelo -174C (Zheng et al., 2000).

#### **- Polimorfismo do gene *IL10* -1082 A/G**

Um par de iniciadores para a amplificação do fragmento da região promotora contendo este polimorfismo foi utilizado: **5'-CCAAGACAACACTACTAAGGCTCCTTT-3'** e **5'-GCTTCTTATATGCTAGTCAGGTA-3'**. O protocolo realizado foi constituído de denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos por denaturação a 95°C por 5 minutos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto do PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição **EcoN I** a 37°C *overnight* e sua digestão evidenciada em gel de agarose 3% com BE. A partir disto pôde-se identificar a presença do alelo -1082A constituído por dois fragmentos de 280 pb e 97 pb e do alelo -1082G constituído por fragmentos de 252 pb, 97 pb e 280 pb (Sun et al., 2010).

#### **- Polimorfismo do gene *IL10* -592 A/C**

Para este SNP o seguinte par de iniciador foi utilizado: **5'-GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3'** e **5'-CCTAGGTCACAGTGACGTGG-3'** e as

condições de reação da PCR consistiram em denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos por denaturação a 95°C, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto do PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição **Rsa I** a 37°C *overnight* e sua digestão evidenciada em gel de agarose 3% com BE. Dessa maneira, os fragmentos de 176 pb + 236 pb e 412 pb foram obtidos caracterizando respectivamente os alelos 1 (-592A) e 2 (-592C) (Sun et al., 2010).

### **- Polimorfismo do gene *IL10*- 819G/A**

Este SNP foi estudado por meio de ensaios de PCR em Tempo Real (RT-PCR) com utilização do sistema TaqMan® SNP Genotyping Assay.

O kit contendo pares de iniciadores, sondas e Master Mix foi adquirido da Applied Biosystems e o protocolo foi seguido conforme orientações do fabricante para o ensaio C\_1747362\_10, rs 1800871 no equipamento ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). O volume final da reação para amostra foi de 5 µL e as condições foram 50°C por 5 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. Tendo em vista a validação dos dados por meio desta técnica, alguns casos foram seqüenciados e os polimorfismos confirmados.

### **Obtenção dos dados clínicos**

Pacientes adultos com diagnóstico de PTI atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia – Hemocentro da UNICAMP (Campinas, SP) tiveram

seus prontuários avaliados quanto a data de nascimento, data do diagnóstico, PTI primária ou secundária, presença ou ausência de doenças associadas, *status* na avaliação, tipo de tratamento, resposta ao tratamento e contagem de plaquetas ao diagnóstico. Estas informações foram colocadas em um formulário (anexo 3) e posteriormente relacionadas com os padrões polimórficos de cada gene estudado.

## **Métodos estatísticos**

Para o estudo da distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos foi utilizado o cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para os demais testes como comparação entre as frequências gênicas e alélicas dos grupos estudados e também comparação da resposta clínica com os padrões polimórficos, foi utilizado o teste exato de Fisher com o uso do programa R Development Core Team (2011). Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**



## **Análise dos Dados Clínicos**

De todos os pacientes selecionados para o estudo, foi possível a consulta de 155 prontuários com a obtenção de dados clínicos já descritos anteriormente. Destes 155 pacientes, 140 (90,3%) realizaram algum tipo de tratamento e 15 (9,7%) não realizaram, tendo somente o acompanhamento da contagem plaquetária.

Foi possível determinar a idade de 144 pacientes. A maioria deles, ou seja, 126 pacientes, foi diagnosticada com menos de 60 anos, representando 87,5% da população estudada. Uma minoria, 12,5% foi diagnosticada com mais de 60 anos. Do total de pacientes, 118 foram mulheres, correspondendo a 76% e 37 foram homens correspondendo a 24%. Dentre eles, 57 (36,7%) apresentaram PTI secundária à doenças como Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide (SAAF), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), hepatite, infecção pelo HIV, H. Pylori, dentre outros.

Entre 155 pacientes, de 135 que realizaram corticoterapia (CO), 87 (64,4%) tiveram resposta positiva e 48 (35,6%) não obtiveram resposta ou obtiveram resposta parcial. Foi considerada boa resposta ou resposta positiva aquela em que o nível de plaquetas aumentou significativamente para um número maior ou igual a  $150.000/\text{mm}^3$ ; resposta parcial aquela em que o número de plaquetas ficou entre 50.000 e  $150.000/\text{mm}^3$  e sem resposta aquela em o nível de plaquetas permaneceu abaixo de  $50.000/\text{mm}^3$  de sangue.

Entre 155 pacientes, de 59 que realizaram esplenectomia, 45 (76,3%) obtiveram boa resposta, contra 14 (23,7%) sem resposta ou com resposta parcial. Daqueles que fizeram uso de Dapsona como terapia, 19 (47,5%) obtiveram resposta positiva contra 21 (52,5%) sem resposta ou com resposta parcial. Um pequeno grupo fez uso de imunoglobulina, e do total de 13 pacientes, 6 responderam

positivamente correspondendo a 46,2% e 7 (53,8%) não responderam ou responderam parcialmente.

Foram ainda observados outros tipos de terapêutica como a utilização de Azatioprina, Ciclofosfamida, Sulfassalazina e Rituximab. Aqueles que realizaram pelo menos um desses tratamentos foram reunidos em um só grupo (denominado “outros tratamentos”) totalizando 17 pacientes. Destes, 6 obtiveram boa resposta (35,3%) enquanto que 11 (64,7%) permaneceram sem resposta ou com resposta parcial.

Outro aspecto considerado foi a contagem de plaquetas ao diagnóstico e este dado demonstrou que 53% dos pacientes apresentaram plaquetas abaixo de 20.000/ mm<sup>3</sup> de sangue.

As informações como sexo afetado, PTI primária ou secundária estão mostradas na tabela 1. As demais, bem como respostas ao tratamento e padrão polimórfico associado estão explicitadas nos anexos.

### **Análise de polimorfismos**

Foram analisados os polimorfismos *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL1B*- 511C/T, *IL1B*+ 3953C/T, *IL4* -590C/T, *IL4* intron 3 VNTR, *IL6* -174 GC, *IL10* -1082GA, *IL10* -819CT e *IL10* -592AC. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi mantido no grupo de portadores de PTI e no grupo controle para todos os polimorfismos estudados, com exceção de *IL1RN* intron 2 VNTR e *IL4* -590C/T em ambos os grupos.

As figuras 2 e 3 evidenciam os padrões polimórficos dos genes estudados por RFLP e RT-PCR.

## - Polimorfismos do complexo do gene *IL1B*

As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos dos genes *IL1RN* intron 2 VNTR, *IL1B*- 511C/T e *IL1B*+ 3953C/T estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Para o polimorfismo *IL1B*- 511C/T, as frequências dos genótipos CC, CT e TT para o grupo de portadores de PTI foi de 20,8%, 55,5% e 23,7%, respectivamente e para o grupo controle elas foram de 26,9%, 56,3% 16,8%, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p= 0,24$ ) e nem mesmo entre os alelos, em que as frequências foram C 48,5%, T 51,5% para o grupo de portadores de PTI e C 55%, T 45% para o grupo controle ( $p= 0,122$ ; OR= 0,77; IC=0,55 a 1.07). Também não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os fenótipos baixo e alto produtor caracterizados pelo agrupamento CT+TT (alto) e CC (baixo) ( $p=0,22$  e OR=0,71; IC=0,41 a 1,25).

Para o polimorfismo *IL1B* +3953C/T as frequências dos genótipos foram CC 61,9%, CT 32,1% e TT 6% para o grupo de portadores de PTI e CC 55,5%, CT 39,5% e TT 6% para o grupo controle. Nesta distribuição de genótipos não houve diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,417$ ). A distribuição alélica foi C 78%, T 22% para o grupo de portadores de PTI e C 75,2%, T 24,8% para o grupo controle, também não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,439$ ; OR= 1,17; IC= 0,78 a 1,73). Entre os fenótipos de alta (CT + TT) e baixa (CC) produção, igualmente às análises anteriores, não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,29$ ; OR=1,3; IC= 0,8 a 2,12).

No estudo do polimorfismo do gene *IL1RN* intron 2 VNTR foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de portadores de PTI e o grupo controle ao analisar as frequências dos genótipos e dos alelos 1, 2, 3 e 4

( $p < 0,001$ ). Esta diferença pode ser observada nas Tabelas 2 e 3. Também, numa análise mais específica, foi possível observar que a diferença entre o grupo de portadores de PTI e grupo controle que apresentaram em seu genótipo pelo menos um alelo 2 foi estatisticamente significativa sugerindo que a ausência do alelo 2 no genótipo confere uma situação de risco para pacientes do estudo ( $p < 0,001$ ; OD= 4,15; IC= 2.31 a 7.58).

#### - Polimorfismos do gene *IL4*

A população controle e a portadora de PTI estudadas apresentaram distribuições de frequência gênica e alélica para o polimorfismo *IL4 -590C/T* demonstradas nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. Elas foram CC 0,97%, CT 41,5% e TT 57,5% para o grupo de portadores de PTI e CC 2,5%, CT 74,8% e TT 22,7% para o grupo controle. A comparação entre essa distribuição demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Comparando-se as frequências entre os alelos C e T nos dois grupos estudados obteve-se C 21,7% e T 78,3% para o grupo de portadores de PTI e C 40% e T 60% para o grupo controle obtendo também uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ; OR= 0,42; IC= 0,29 a 0,6). Este dado sugere que o alelo C seja interpretado como fator de proteção ao desenvolvimento da doença, ou mesmo que o alelo T seja um fator de risco para o desenvolvimento da mesma. A análise das frequências CC + CT (baixo produtor) com TT (alto produtor) mostrou-se estatisticamente significativa evidenciando o papel do fenótipo baixo produtor como protetor para o desenvolvimento da doença ( $p < 0,001$ ; OR= 0,22; IC= 0,12 a 0,37).

Para o polimorfismo *IL4 intron 3 VNTR* as frequências dos genótipos e dos alelos encontrados estão representados nas tabelas 2 e 3 respectivamente. O

genótipo 1.1 apresentou frequência 62,8%, 1.2 29,5% e 2.2 7,7% no grupo de portadores de PTI e no grupo controle as frequências foram 1.1 54%, 1.2 30,4% e 2.2 15,6% não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p=0,067$ ). A frequência do alelo 1 foi 77,6% e do alelo 2 foi 22,4% no grupo de portadores de PTI, enquanto que no grupo controle ela foi de 69,5% e 30,5% respectivamente para o alelo 1 e alelo 2. A análise estatística evidenciou uma diferença significativa sugerindo que o alelo 1 confere risco aumentado para o desenvolvimento da doença ( $p=0,024$ ; OR=1,51; IC= 1,056 a 2,179).

Também comparou-se entre os grupos de portadores de PTI e grupo controle a combinação dos genótipos 1.1 com 1.2 + 2.2. Esta análise demonstrou-se não significativa com frequências 1.1 62,8% e 1.2 + 2.2 37,2% no grupo de portadores de PTI e 1.1 54% e 1.2 + 2.2 46% no grupo controle ( $p=0,125$ ; OR=1,44; IC=0,88 a 2,35).

#### **- Polimorfismo do gene *IL6***

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene ***IL6 -174 GC*** estão demonstradas nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. No grupo de portadores de PTI, esta frequência foi GG 53,17%, CG 37% e CC 9,75% e no grupo controle foi de GG 57,1%, GC 37% e CC 5,9%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ( $p=0,485$ ). As frequências alélicas foram G 71,7% e C 28,3% para o grupo de portadores de PTI e G 75,6% e C 24,4% para o grupo controle e também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre eles ( $p=0,312$ ; OR= 1,22; IC= 0,84 a 1,8).

Na comparação entre grupos de genes codificadores de alta e baixa produção de IL6, ou seja, CC (baixo produtor) com GC +GG (alto produtor) e GC + CC (baixo produtor) com GG (alto produtor), não foram encontradas diferenças

estatisticamente relevantes ( $p=0,298$ ;  $OD= 1,73$ ;  $IC= 0,67$  a  $4,99$  e  $p= 0,563$ ;  $OD= 1,17$ ;  $IC= 0,73$  a  $1,9$  respectivamente).

### **- Polimorfismos do gene *IL10* e estudo dos seus haplótipos**

Assim como para os demais polimorfismos estudados, as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene *IL10* nas posições -592, -819 e -1082 estão demonstradas nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. Isoladamente, ao analisar frequências genotípicas e alélicas, nenhum polimorfismo apresentou diferenças estatisticamente significativas.

Para a posição **-592** a frequência foi de AA 9,2%, AC 40,3% e CC 50,5% para o grupo de portadores de PTI; para o grupo controle foi de AA 13,5%, AC 39,8% e CC 46,7% ( $p= 0,459$ ). Para os alelos do mesmo polimorfismo as frequências foram A 29,3% e C 70,7% para o grupo de portadores de PTI e A 33,5% e C 66,5% para o grupo controle ( $p= 0,286$ ;  $OR= 0,83$ ;  $IC= 0,58$  a  $1,19$ ). Também a análise estatística da associação dos genótipos caracterizando fenotipicamente altos e baixos produtores [AA (alto) com AC+CC (baixo) e AA+AC (alto) com CC (baixo)] não demonstrou nenhuma diferença significativa ( $p=0,262$ ;  $OR=0,65$ ;  $IC= 0,3$  a  $1,42$  e  $p=0,56$ ;  $OR=0,86$ ;  $IC= 0,53$  a  $1,39$  respectivamente).

Para o polimorfismo localizado na posição **-819**, as frequências genotípicas encontradas foram CC 47,1%, CT 40,7%, TT 12,2% no grupo de portadores de PTI e CC 43,7%, CT 43,7%, TT 12,6% e no grupo controle, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ( $p=0,822$ ). As frequências alélicas foram C 67,5% e T 32,5% para o grupo de portadores de PTI e C 65,5% e T 34,5% para o grupo controle ( $p=0,661$ ;  $OR=0,92$ ;  $IC= 0,64$  a  $1,31$ ). Nas combinações genotípicas para fenótipos de alto e baixo produtores obtivemos para o grupo de portadores de

PTI TT 12,2% (alto), (CT + CC) 87,8% (baixo) e para o grupo controle TT 12,6% (alto), (CT + CC) 87,4% (baixo) ( $p= 1$ , OR= 0,96; IC= 0.46 a 2.08). Para a segunda comparação de combinações genotípicas, as freqüências foram (CT + TT) 52,9%, CC 47,1% para o grupo de portadores de PTI e (CT + TT) 56,3%, CC 43,7% para o grupo controle. Nesta análise também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p= 0,639$  e OR= 0,87; IC= 0,54 a 1,42).

Enfim para o polimorfismo na posição **-1082** observamos que as freqüências para o grupo de portadores de PTI foram AA 36,3%; AG 51,4% e GG 12,3% e para o grupo controle foram AA 38,7%; AG 50,4% e GG 10,9% não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p=0,895$ ). As freqüências alélicas encontradas foram A 62% e G 38% para o grupo de portadores de PTI e A 64% e G 36% para o grupo controle ( $p= 0,676$ ; OR= 0,92; IC= 0,66 a 1,3). Na comparação entre grupos de genes codificadores de alta e baixa produção de IL10, ou seja, AA (baixo produtor) com AG + GG (alto produtor) e AA + AG (baixo produtor) com GG (alto produtor) as freqüências foram AA 36,3%; (AG + GG) 63,7% para o grupo de portadores de PTI e AA 38,6%; (AG + GG) 61,4% para o grupo controle ( $p= 0,723$ ; OR= 0,91; IC= 0,56 a 1,48). Também obteve-se (AA + AG) 87,7%; GG 12,3% para o grupo e portadores de PTI e (AA + AG) 89%; GG 11% para o grupo controle sem diferenças estatisticamente significativas ( $p= 0,859$ ; OR= 0,88; IC= 0,4 a 1,86).

## **- Haplótipos de *IL10* ( -1082GA; -819CT; -592AC)**

No estudo de haplótipos de *IL10*, os polimorfismos foram agrupados em: Alto produtor (GCC/GCC), Médio produtor (GCC/ACC; GCC/ATA) e Baixo produtor (ACC/ACC; ACC/ATA e ATA/ATA) (Crawley et al., 1999).

Os três grupos entre si foram comparados e para o grupo de portadores de PTI o genótipo de baixo produtor foi correspondente a 39,8%, o de médio foi 47,5% e de baixo 12,7%. Na população controle eles foram 50,5%, 48,4% e 1,1% respectivamente. Para esta comparação houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ). Agrupando os fenótipos e realizando comparação entre Baixo Produtor com Médio + Alto, chegamos a um resultado estatisticamente não significativo ( $p=0,094$ ; OD=0,65; IC= 0,38 a 1,11). Já quando comparamos o fenótipo Alto produtor com Médio + Baixo obtivemos um valor estatisticamente significativo sugerindo que indivíduos com o haplótipo codificador Alto Produtor poderiam ter maior risco de desenvolver a doença quando comparados aos outros genótipos ( $p=0,001$ ; OD= 0,08; IC= 0 a 0,49).

## **Análise de polimorfismos associados à resposta clínica**

Com o objetivo de compreendermos melhor o motivo de os pacientes muitas vezes responderem diferentemente a diversas formas de terapia, foi analisado o tipo de resposta ao tratamento (positiva, negativa ou parcial) e qual o padrão polimórfico cada tipo de resposta apresentou. Para cada grupo foi aplicado um teste estatístico com intenção de detectar diferenças significativas e então criar a possibilidade de associar o diagnóstico molecular com uma melhor forma de terapêutica.

Para os polimorfismos *IL1* -511C/T, *IL1* +3953C/T, *IL1RN* intron2 VNTR, *IL4* intron 3 VNTR, *IL4* -590C/T, *IL6* -176G/C, *IL10* -1082G/A, *IL10* -819C/T, *IL10* -592A/C e também para os haplótipos de *IL10* não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa quando comparou-se resposta positiva versus resposta negativa ou parcial quando realizada corticoterapia, imunoglobulina, dapsona e outros tratamentos (que incluem Azatioprina, Ciclofosfamida, Sulfassalazina, Rituximab). Também não houve diferença quando comparou-se o grupo que não realizou nenhum tipo de tratamento com o grupo que realizou, independente de qual foi o tratamento.

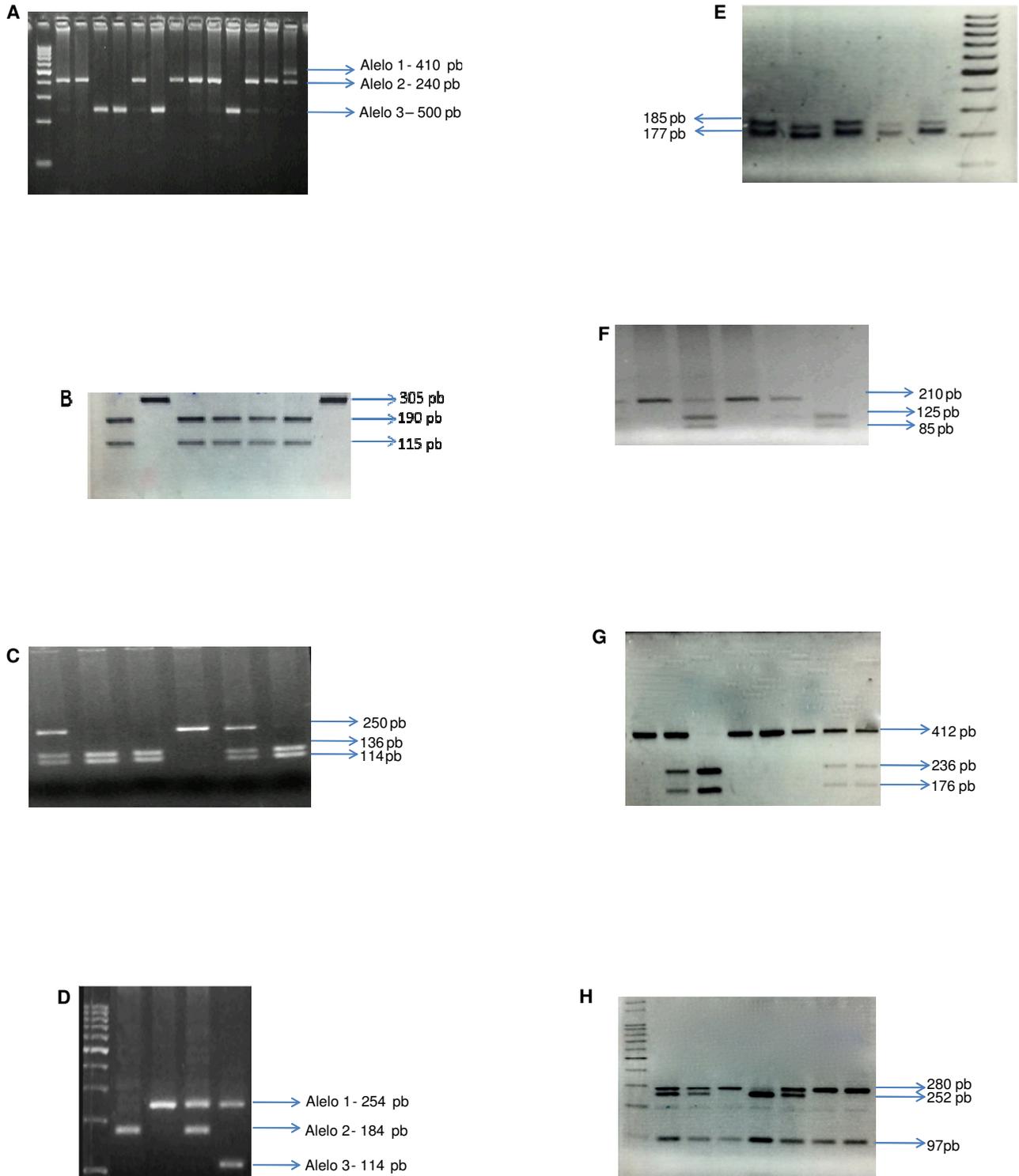
Entretanto, para o polimorfismo *IL1B* -511C/T encontrou-se uma possível associação quando comparados os tipos de resposta à esplenectomia (positiva e sem resposta/resposta parcial) e os padrões polimórficos apresentados pelo grupo de portadores de PTI. Analisando a distribuição dos genótipos e dos alelos isoladamente deste polimorfismo, não foi possível estabelecer qualquer associação, porém ao comparar os grupos de fenótipos baixo produtor (CC) e alto produtor (CT + TT) com o tipo de resposta à esplenectomia, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa.

Dos pacientes que apresentaram resposta positiva a esplenectomia, a frequência do genótipo CC (baixo produtor) foi de 27,3% e da combinação CT + TT (alto produtor) foi de 72,7%. Dentre aqueles que não obtiveram resposta ou obtiveram resposta parcial, nenhum apresentou o genótipo CC, mas 100% estavam inseridos no grupo de alta produção sugerindo que o genótipo CC possa ser um fator de importância e que há uma tendência daqueles que são CC de responderem bem a esse tipo de tratamento ( $p= 0,049$ ; OR= inf., IC= 0,94 a inf). Estas informações estão explicitadas na tabela 4.

## **Contagem de plaquetas ao diagnóstico e polimorfismos**

Outro dado o qual julgou-se importante avaliar foi a contagem de plaquetas ao diagnóstico, pois um número baixo (abaixo de  $20.000/\text{mm}^3$ ) pode estar associado a um risco de sangramento grave. Foi realizada a comparação entre o grupo em que o número de plaquetas foi igual ou abaixo de  $20.000/\text{mm}^3$  e o grupo em que o número de plaquetas foi acima de  $20.000/\text{mm}^3$  para cada um dos polimorfismos. Não foi possível observar na análise estatística nenhuma evidência que pudesse sugerir a associação entre os polimorfismos estudados e a contagem de plaquetas ao diagnóstico.

**Figura 2:** Géis de eletroforese evidenciando os padrões polimórficos dos genes estudados. **A-** *IL1RN* intron 2 VNTR; **B-** *IL1B* -511C/T; **C-** *IL1B*+ 3953C/T; **D-** *IL4* intron 3 VNTR; **E-** *IL4* -590C/T; **F-** *IL6*-176 C/G; **G-** *IL10*-592A/C; **H-** *IL10* -1082G/A



**Figura 3:** Padrões polimórficos de *IL10* -819C/T evidenciados por Real-Time PCR (RT-PCR).  
**A-** Amplificação do alelo A; **B-** Amplificação do alelo G; **C-** Amplificação do alelo A e do alelo G.

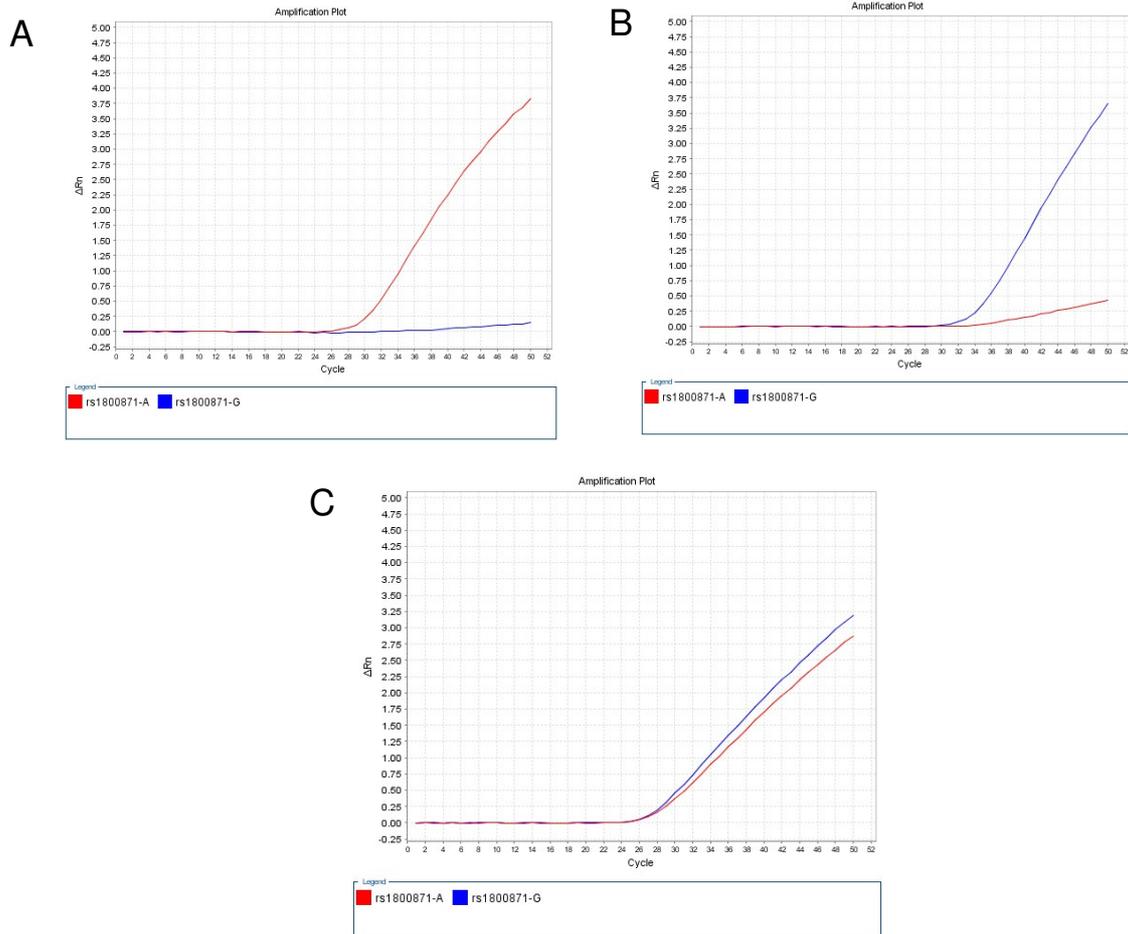


Tabela 1: Pacientes do estudo agrupados de acordo com sexo, PTI primária ou PTI secundária.

Sexo Feminino			Sexo Masculino		
PTI Primária	PTI Secundária		PTI Primária	PTI Secundária	
		<b>Secundária à</b>			<b>Secundária à</b>
PTI 249	PTI 6	Anti coag lúpico +	PTI 53	PTI 204	Anti coag lúpico +
PTI 196	PTI 164	drogas	PTI 246	PTI 100	SAAF + LES
PTI 116	PTI 59	SAAF	PTI 73	PTI 103	SAAF
PTI 79	PTI 27	Anti coag lúpico +	PTI 257	PTI 278	H. Pylori
PTI 75	PTI 107	paraneoplasia	PTI 272	PTI 99	Anti coag lúpico +
PTI 70	PTI 175	medicamentos	PTI 2	PTI 29	HIV +
PTI 58	PTI 214	LES	PTI 135	PTI 127	SAAF
PTI 39	PTI 229	H Pylori	PTI 15	PTI 33	subst agrotóxica
PTI 5	PTI 91	LES	PTI 25	PTI 57	Hepatite B + SAAF
PTI 18	PTI 219	uso de anticonvulsivante	PTI 60	PTI 56	drogas
PTI 224	PTI 150	CMV+, LES	PTI 280	PTI 172	HIV +
PTI 120	PTI 153	CMV+	PTI 149	PTI 156	H Pylori
PTI 326	PTI 117	colagenose, LES	PTI 78	PTI 121	Transplante rim
PTI 308	PTI 282	artrite reumatóide	PTI 63	PTI 275	Varicela
PTI 4	PTI 263	drogas	PTI 24	PTI 256	CMV +
PTI 16	PTI 262	LES	PTI 267	PTI 90	Anti coag lúpico +
PTI 32	PTI 331	H Pylori	PTI 291	PTI 51	SAAF
PTI 41	PTI 255	SAAF	PTI 307	PTI 48	Anti coag lúpico +
PTI 71	PTI 30	SAAF, LES		PTI 279	Hepatite C
PTI 159	PTI 178	SAAF			
PTI 158	PTI 168	SAAF			
PTI 274	PTI 304	drogas			
PTI 222	PTI 83	HIV +			
PTI 81	PTI 165	colagenose, LES			
PTI 12	PTI 333	CMV+			
PTI 176	PTI 45	drogas			
PTI 34	PTI 242	SAAF			
PTI 298	PTI 237	H Pylori			
PTI 193	PTI 11	CMV+			
PTI 104	PTI 8	SAAF, anticoag lúpico+			
PTI 118	PTI 64	HIV+			
PTI 314	PTI 157	drogas			
PTI 161	PTI 170	Hepatite C			
PTI 261	PTI 253	LES			
PTI 162	PTI 238	neoplasia			
PTI 166	PTI 243	SAAF			
PTI 155	PTI 190	Câncer pâncreas			
PTI 144	PTI 167	SAAF, anticoag lúpico+			
PTI 143					
PTI 177					
PTI 250					
PTI 273					
PTI 299					
PTI 296					
PTI 323					
PTI 10					
PTI 19					
PTI 72					
PTI 96					
PTI 46					
PTI 47					
PTI 44					
PTI 22					
PTI 192					
PTI 223					
PTI 265					
PTI 290					
PTI 62					

Tabela 1: CONTINUAÇÃO- Pacientes do estudo agrupados de acordo com sexo, PTI primária ou PTI secundária.

Sexo Feminino	
PTI Primária	PTI Secundária

Secundária à

PTI 54  
 PTI 52  
 PTI 50  
 PTI 1  
 PTI 312  
 PTI 241  
 PTI 211  
 PTI 17  
 PTI 66  
 PTI 21  
 PTI 131  
 PTI 311  
 PTI 213  
 PTI 126  
 PTI 85  
 PTI 87  
 PTI 254  
 PTI 189  
 PTI 244  
 PTI 228  
 PTI 318  
 PTI 327

Tabela 2: Frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C e haplótipos de *IL10* em pacientes e controles.

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
<b><i>IL1B</i> -511C/T</b>	CC		43 (20,8%)	32 (26,9%)	
	CT		115 (55,5%)	67 (56,3%)	p=0,24 (NS)
	TT		49 (23,7%)	20 (16,8%)	
<b><i>IL1B</i> +3953 C/T</b>	CC	Baixo Produtor	43 (20,8%)	32 (26,9%)	p=0,22 OR=0,71
	CT + TT	Alto Produtor	164 (79,2%)	87 (73,1%)	IC 95%=0,41 a 1,25 (NS)
<b><i>IL1B</i> +3953 C/T</b>	CC		125 (61,9%)	66 (55,5%)	
	CT		65 (32,2%)	47 (39,5%)	p=0,417 (NS)
	TT		12 (5,9%)	6 (5%)	
<b><i>IL1B</i> +3953 C/T</b>	CC	Baixo Produtor	125 (61,9%)	66 (55,5%)	p=0,29 OR=1,3
	CT + TT	Alto Produtor	77 (38,1%)	53 (44,5%)	IC 95%=0,8 a 2,12

Tabela 2. CONTINUAÇÃO

Frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C e haplótipos de *IL10* em pacientes e controles.

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
<i>IL1RN</i> intron 2 VNTR	1.1		148 (73,3%)	69 (58,4%)	
	1.2		5 (2,5%)	27 (22,8%)	
	2.3		4 (1,9%)	3 (2,5%)	
	2.2		18 (8,9%)	18 (15,5%)	p<0.001
	3.3		20 (9,9%)	0 (0%)	
	outros		7 (3,5%)	1(0,8%)	
2.2			18 (8,9%)	18 (15,3%)	p=0.099 OR=0.54
	outros		184 (91,1%)	100 (84,7%)	IC 95%=0.25 a 1.16 (NS)
sem alelo 2			176 (87,1%)	73 (61,9%)	p<0.001 OR=4,15
	com alelo 2		26 (12,9%)	45 (38,1%)	IC95%=2.31 a 7.58

Tabela 2. CONTINUAÇÃO

Frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C e haplótipos de *IL10* em pacientes e controles.

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
<i>IL4</i> -590C/T	CC		2 (0,9%)	3 (2,5%)	
	CT		85 (41,5%)	89 (74,8%)	<b>p&lt;0.001</b>
	TT		118 (57,6%)	27 (22,7%)	
<i>IL4</i> intron3 VNTR	CC + CT	Baixo Produtor	87 (42,4%)	92 (77,3%)	<b>p&lt;0.001</b> OR=0.22
	TT	Alto Produtor	118 (57,6%)	27 (22,7%)	IC95%=0.12 a 0.37
<i>IL4</i> intron3 VNTR	1.1		130 (62,8%)	62 (53,9%)	
	1.2		61 (29,5%)	35 (30,4%)	p=0.067 (NS)
	2.2		16 (7,7%)	18 (15,7%)	
<i>IL4</i> intron3 VNTR	1.1		130 (62,8%)	62 (53,9%)	p=0.125 OR=1.44
	1.2 + 2.2		77 (37,2%)	53 (46,1%)	IC95%=0.88 a 2.35

Tabela 2. CONTINUAÇÃO

Frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C e haplótipos de *IL10* em pacientes e controles.

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
	GG		109 (53,2%)	68 (57,1%)	
	GC		76 (37%)	44 (37%)	p=0.485 (NS)
	CC		20 (9,8%)	7 (5,9%)	
<b><i>IL6</i> -174 G/C</b>	GC + CC	Baixo Produtor	96 (46,8%)	51 (42,9%)	p=0.563 OR=1.17
	GG	Alto Produtor	109 (53,2%)	68 (57,1%)	IC95%=0.73 a 1.9 (NS)
	CC	Baixo Produtor	20 (9,8%)	7 (5,9%)	p=0.298 OR=1.73
	GG + GC	Alto Produtor	185 (90,2%)	112 (94,1%)	IC95%=0.67 a 4.99 (NS)

**Tabela 2. CONTINUAÇÃO**

**Frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C e haplótipos de *IL10* em pacientes e controles.**

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
	GG		26 (12,3%)	13 (10,9%)	
	GA		109 (51,4%)	60 (50,4%)	p=0.895 (NS)
	AA		77 (36,3%)	46 (38,7)	
<b><i>IL10</i> -1082 G/A</b>	AA	Baixo Produtor	77 (36,3%)	46 (38,7%)	p=0.723 OR=0.91
	GG + GA	Alto Produtor	135 (63,7%)	73 (61,3%)	IC95%=0.56 a 1.48 (NS)
	GA + AA	Baixo Produtor	186 (87,7%)	106 (89,1%)	p=0.859 OR=0.88
	GG	Alto Produtor	26 (12,3%)	13 (10,9%)	IC95%=0.4 a 1.86 (NS)

Tabela 2. CONTINUAÇÃO

Frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C e haplótipos de *IL10* em pacientes e controles.

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
	CC		89 (47,1%)	52 (43,7%)	
	CT		77 (40,7%)	52 (43,7%)	p=0.822 (NS)
	TT		23 (12,2%)	15 (12,6%)	
<i>IL10</i> -819 C/T	CT + TT	Baixo Produtor	100 (52,9%)	67 (56,3%)	p=0.639 OR=0.87
	CC	Alto produtor	89 (47,1%)	52 (43,7%)	IC95%=0.54 a 1.42 (NS)
	TT	Baixo Produtor	23 (12,2%)	15 (12,6%)	p=1 OR=0.96
	CT + CC	Alto produtor	166 (87,8%)	104 (83,4%)	IC95%=0.46 a 2.08 (NS)

Tabela 2. CONTINUAÇÃO

Frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6*-174G/C; *IL10*-1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C e haplótipos de *IL10* em pacientes e controles.

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
	AA		18 (9,2%)	16 (14,8%)	
	AC		79 (40,3%)	47 (43,5%)	p=0.459 (NS)
	CC		99 (50,5%)	45 (41,7%)	
<i>IL10</i> -592 A/C	AA	Alto produtor	18 (9,2%)	16 (18,2%)	p=0.262 OR=0.65
	AC + CC	Baixo Produtor	178 (90,8%)	72 (81,8%)	IC95%=0.3 a 1.42 (NS)
AA + AC	AA + AC	Alto produtor	97 (49,5%)	63 (53,4%)	p=0.56 OR=0.86
	CC	Baixo Produtor	99 (50,5%)	55 (46,6%)	IC95%=0.53 a 1.39 (NS)

Tabela 2. CONTINUAÇÃO

Frequência dos genótipos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C e haplótipos de *IL10* em pacientes e controles.

Polimorfismo genes	Genótipo	Fenótipo provável associado	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
	GCC/GCC	Alto produtor	23 (12,7%)	1 (1,1%)	
	GCC/ACC GCC/ATA	Produtor Intermediário	86 (47,5%)	44 (48,4%)	<b>p&lt;=0.001</b>
	ACC/ACC ACC/ATA ATA/ATA	Baixo Produtor	72 (39,8%)	46 (50,5%)	
<b><i>IL10</i></b> <b>-1082/ -819/ -592</b>	ACC/ACC ACC/ATA ATA/ATA	Baixo Produtor	72 (39,8%)	46 (50,5%)	p=0.094 OR=0.65 IC95%=0.38 a 1.11
	GCC/ACC GCC/ATA GCC/GCC	Intermediário + Alto Produtor	109 (60,2%)	45 (49,5%)	
	ACC/ACC ACC/ATA ATA/ATA GCC/ACC GCC/ATA	Baixo + Intermediário Produtor	158 (87,3%)	90 (98,9%)	<b>p=0,001</b> OR=0,08 IC95%=0 a 0.49
	GCC/GCC	Alto produtor	23 (12,7%)	1(1,1%)	

**Tabela 3: Frequência dos alelos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C em pacientes e controles**

Polimorfismo genes	Alelo	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
<b><i>IL1B</i> - 511C/T</b>	C	201 (48,6%)	131 (55%)	p=0.122 OR=0.77 IC95%=0.55 a 1.07
	T	213 (51,4%)	107 (45%)	
<b><i>IL1B</i> +3953 C/T</b>	C	315 (78%)	179 (75,2%)	p=0.439 OR=1.17 IC95%=0.78 a 1.73
	T	89 (22%)	59 (24,8%)	
<b><i>IL1RN</i> intron 2 VNTR</b>	1	306 (75,7%)	169 (71,6%)	
	2	44 (10,9%)	63 (26,7%)	
	3	47 (11,6%)	3 (1,3%)	<b>p&lt;0,001</b>
	4	7 (1,7%)	1 (0,4%)	

Tabela 3. CONTINUAÇÃO

Frequência dos alelos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C em pacientes e controles

Polimorfismo genes	Alelo	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
<i>IL4</i> -590 C/T	C	89 (21,7%)	95 (39,9%)	<b>p&lt;0,001</b> OR=0.42 IC95%=0.29 a 0.6
	T	321 (78,3%)	143 (60,1%)	
<i>IL4</i> intron 3 VNTR	1	322 (77,6%)	162 (69,5%)	<b>p=0,024</b> OR=1.51 IC95%=1.05 a 2.17
	2	93 (22,4%)	71 (30,5%)	
<i>IL6</i> -174 G/C	C	116 (28,3%)	58 (24,4%)	p=0.312 OR=1.22 IC95%=0.84 a 1.8
	G	294 (71,7%)	180 (75,6%)	

Tabela 3. CONTINUAÇÃO

Frequência dos alelos dos polimorfismos *IL1B* -511C/T; *IL1B* +3953C/T; *IL1RN* intron 2 VNTR; *IL4* -590C/T; *IL4* intron 3 VNTR; *IL6* -174G/C; *IL10* -1082G/A; *IL10* -819C/T; *IL10* -592A/C em pacientes e controles

Polimorfismo genes	Alelo	Pacientes com PTI	Pacientes Controles	Teste Estatístico
<b><i>IL10</i> -1082 G/A</b>	A	263 (62%)	152 (63,9%)	p=0.676 OR=0.92 IC95%=0.66 a 1.3
	G	161 (38%)	86 (36,1%)	
<b><i>IL10</i> -819 C/T</b>	T	123 (32,5%)	82 (34,5%)	p=0.661 OR=0.92 IC95%=0.64 a 1.31
	C	255 (67,5%)	156 (65,5%)	
<b><i>IL10</i> -592 A/C</b>	A	115 (29,3%)	79 (33,5%)	p=0.286 OR=0.83 IC95%=0.58 a 1.19
	C	277 (70,7%)	157 (66,5%)	

posta a

Polimorfismo do gene <i>IL1B</i> -511C/T e Resposta à Esplenectomia			
Genes	Resposta Positiva	Sem Resposta/Resposta Parcial	Teste Estatístico
CC	12 (27,3%)	0 (0%)	p=0,078 (NS)
CT	22 (50%)	8 (61,5%)	
TT	10 (22,7%)	5 (38,5%)	
C	46 (52,3%)	8 (30,8%)	p=0.073 OR=2.45 IC=0.9 a 7.22
T	42 (47,7%)	18 (69,2%)	
CC	12 (27,3%)	0 (0%)	p=0.05 OR=inf IC=0.94 a inf
CT + TT	32 (72,7%)	13 (100%)	

## **DISCUSSÃO**



Ainda hoje, os fatores de risco para o início e desenvolvimento da Púrpura Trombocitopênica Imune permanecem em debate, com fatores genéticos e ambientais podendo colaborar para o desencadeamento da mesma. Ao contrário de mutações, que costumam apresentar baixa frequência na população (menores que 1%), algumas variações alélicas, como Polimorfismos de Base Única (SNPs), têm demonstrado uma associação com o risco de desenvolvimento de doenças em uma série de estudos epidemiológicos (Karimi M, 2009; Shih et al., 2006). Essas alterações polimórficas podem provocar vantagens ou desvantagens no metabolismo inerente a certos tipos de patologias, contribuindo na determinação de diferentes susceptibilidades e diferentes respostas clínicas no decorrer do tratamento (Pehlivan et al., ; Rocha et al., ; Sarpatwari et al.). Diferentes atividades celulares podem ser promovidas frente alterações na sequência do DNA codificante ou relacionada ao gene.

No caso de citocinas, a maioria desses polimorfismos encontram-se na região promotora do gene, no intron ou na região 3'. Estas são regiões não traduzidas, porém podem influenciar na expressão e função gênica.

Em PTI, a maioria dos estudos relacionados a polimorfismos gênicos avaliam somente crianças (Akin et al., ; Amorim et al., ; Atabay et al., 2003; Foster et al., 2001; Wu KH et al., 2005; Wu KH et al., 2007). Em adultos, poucas populações têm sido estudadas e algumas associações entre a PTI e os polimorfismos têm sido observadas. Em estudo com pacientes adultos japoneses portadores de PTI, Saitoh et al. (2011) sugeriu que o alelo *IL17F* 7488 T, do polimorfismo *IL17F* 7488 T/C, está associado ao desenvolvimento da PTI crônica. Recentemente Pehlivan et al., (2011) na Turquia, demonstrou uma associação entre pacientes adultos portadores de PTI e o polimorfismo do gene *MBL* (Lecitina Ligante de Manose) que é uma proteína

sérica sintetizada no fígado, e que tem uma importante função na imunidade inata do hospedeiro. Sua baixa concentração está associada às variantes alélicas *MBL\*B*, *MBL\*C* e *MBL\*D* e o genótipo *MBL BB* foi encontrado significativamente alto nos pacientes portadores de PTI quando comparados aos controles. Este mesmo trabalho demonstrou que para o polimorfismo do gene do interferon-gama (*IFN-γ*) +874T/A, o genótipo *IFNγ +874TT* estava 3,3 vezes mais presentes em pacientes portadores de PTI.

Dentre os polimorfismos observados no presente estudo está o da interleucina 1 (IL-1) que é uma citocina liberada pelos macrófagos, com grande atividade inflamatória e está envolvida em várias manifestações clínicas em humanos. Os genes do complexo IL-1 estão localizados no cromossomo 2, são polimórficos e codificam três proteínas: IL-1 $\alpha$  (IL-1 alfa), IL-1 $\beta$  (IL-1beta), e IL-1RA (antagonista do receptor da IL-1). Dentre as propriedades das duas formas de IL-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ) estão a habilidade de induzir sono, anorexia e hipotensão. Ela estimula o aumento da síntese de colagenase, produção de prostaglandinas, óxido nítrico e está envolvida nos mecanismos da sepsis (Dinarello e Wolff, 1993). Em adição, a IL-1 estimula a ativação de linfócitos T e B. IL-1Ra é um inibidor específico da atividade da IL -1 sendo a mais importante molécula regulatória da atividade da mesma, agindo no bloqueio da ligação de IL-1 aos receptores de superfície celular (IL-1R) (Arend, 2002; Seckinger e Dayer, 1987).

A IL-1 apresenta um importante envolvimento na resposta imune inata que regula as funções do sistema imune adaptativo. O acúmulo da IL-1 $\beta$  e de seu antagonista (IL-1Ra) apresenta variações relativamente estáveis interindividuais definindo fenótipos de “altos” e “baixos” produtores. Estas variações podem depender de mecanismos de transcrição e/ou pós-transcrição; em ambos os casos

polimorfismos dos genes da IL1- $\beta$  (*IL1B*) e do IL1RA (*IL1RN*) podem estar envolvidos (Danis et al., 1995; Dinarello, 1997; Hurme e Santtila, 1998; Pociot et al., 1992; Santtila et al., 1998). Dos dois polimorfismos de *IL1B* responsáveis pelas variações interindividuais descritas, o da posição -511C/T localiza-se na região promotora do gene (di Giovine FS, 1992) e o da posição +3953C/T localiza-se no quinto exon (Pociot et al., 1992). Os alelos menos comuns (-511T e +3953T) estão relacionados com fenótipos de alta capacidade secretora (Danis et al., 1995; Hurme e Santtila, 1998; Santtila et al., 1998). Estes polimorfismos têm sido associados com diferentes doenças imunes e infecciosas e com o comportamento evolutivo diferenciado em doenças, onde o componente inflamatório é relevante (Arend, 2002; Bioque et al., 1995; El-Omar et al., 2000; Garcia-Gonzalez et al., 2001; Ma et al., 2002). Em trabalhos abordando doenças autoimunes como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) foi demonstrado que o alelo *IL1B* -511T está associado a um risco aumentado para o desenvolvimento da doença (Parks et al., 2004) e em outros abordando esclerose múltipla o genótipo *IL1B* -511 TT foi também associado a um risco aumentado para o desenvolvimento da doença (Mirowska-Guzel D, 2011). Já para estudos do polimorfismo *IL1B* +3953C/T, são escassos os trabalhos envolvendo doenças autoimunes. Entretanto, estudos anteriores envolvendo neutropenia crônica idiopática e reação transfusional febril não hemolítica em pacientes multi-transfundidos não demonstram associações entre sua ocorrência e este polimorfismo (Addas-Carvalho et al., 2005; Addas-Carvalho et al., 2006).

Semelhante aos estudos anteriores realizados na população adulta japonesa portadora de PTI (Saitoh et al., 2004), o estudo dos polimorfismos do complexo do gene *IL1B* no presente estudo não demonstrou associação entre os polimorfismos *IL1B* -511C/T e *IL1B* +3953C/T e a ocorrência da PTI.

No caso do polimorfismo do gene *IL1RN* intron 2 VNTR, foi demonstrado por Santilla et al. (1998) que as citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  têm os seus níveis séricos influenciados pela presença do polimorfismo *IL1RN* intron 2 VNTR. Em seu trabalho, concluiu que a presença do alelo 2 (*IL1RN* \*2) está associada com o aumento da produção de IL-1 $\beta$  *in vitro*.

No estudo de outras doenças autoimunes como esclerose múltipla, Mirowska-Guzel, et al. (2011) não encontraram nenhuma associação entre este polimorfismo e a progressão e susceptibilidade da doença, enquanto o grupo de Dincíc et al. (2006) associou risco aumentado para a mesma doença em pacientes não portadores do alelo 2. Contudo, Rocha et al. (2010), em seu estudo com pacientes adultos portadores de PTI no sudeste brasileiro, concluiu que a presença de pelo menos um alelo 2 no genótipo estava mais frequentemente presente no grupo de portadores de PTI quando comparados ao grupo de doadores de sangue.

No atual estudo, os padrões apresentados para o polimorfismo *IL1RN* intron 2 VNTR apresentaram valor significativo do ponto de vista estatístico e discordam de estudos anteriores envolvendo população adulta portadora de PTI no sudeste brasileiro (Rocha et al. 2010), porém corroboram com os resultados encontrados por Wu et al. (2007) num estudo com crianças, apesar das diferenças na fisiopatologia da PTI entre crianças e adultos. Os resultados são concordantes também com Dincíc et al. (2006) em seu estudo com outra doença autoimune.

A presença do *IL1RN* \*2 associado com expressão aumentada dos genes indutores de inflamação como *IL1B*, deve em muitos casos, induzir uma resposta inflamatória e facilitar o desenvolvimento de manifestações imunes. No presente estudo a associação entre este alelo e a PTI não foi observada provavelmente porque não devemos considerar somente o fator genético como relevante, mas uma

combinação de fatores e mecanismos fisiopatológicos que podem estar envolvidos no desencadeamento da doença.

Outro polimorfismo incluído neste estudo foi o do gene *IL4*. A proteína IL-4 é uma citocina produzida primariamente por linfócitos T CD4+, mastócitos e basófilos e desempenha importante papel antiinflamatório, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e de enzimas proteolíticas nos monócitos (Buchs et al., 2000). Atua na ativação e diferenciação de células B, influencia a troca de isotipos de imunoglobulinas e direciona a polarização de células Th0 para Th2 (Abbas et al., 1997). A IL-4 é a citocina mais importante na polarização das células Th0 em Th2 atuando principalmente na fase indutora da resposta imune predominantemente Th2. Este tipo de resposta confere imunidade protetora principalmente contra helmintos, mas também pode levar a manifestações atópicas caracterizadas pela presença de asma, eczema, rinoconjuntivite e um aumento de IgE no soro (Shirakawa et al., 2000).

Entre outros efeitos de IL-4, inclui-se a inibição da imunidade celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF $\alpha$  e a estimulação da molécula anti-inflamatória IL-1Ra (Vannier et al., 1992). Em doenças sabidamente causadas por células Th1, as citocinas Th2 têm sido consideradas protetoras, portanto a busca pela alteração no padrão de resposta imune de Th1 para Th2 tem sido muito estudada em pesquisas que visam a melhora ou o restabelecimento da tolerância imunológica.

O gene da IL-4 (*IL4*) situado no cromossomo 5 (q23 – 31) num cluster de outros genes de mediadores imunes como *IL3*, *IL5* e *IL13*, possui um polimorfismo de substituição na posição –590 C/T da região promotora do gene e um outro

localizado no intron 3 composto por uma sequência de repetição de 70-bp (VNTR). Estes polimorfismos podem estar associados a variações na transcrição do gene por localizar-se próximo a regiões de controle da transcrição (Wu MC et al., 2003).

No polimorfismo *IL4* -590C/T, o alelo *IL4* -590T tem sido associado a elevados níveis de IL-4 em populações americanas (Rosenwasser, 1997) e japonesas (Noguchi et al., 1997), sugerindo que a troca do alelo C para T na posição -590 aumenta a produção de IL-4. Este polimorfismo foi estudado por Kanemitsu et al. (1999) e Maksymowych et al. (2002) em pacientes com SLE e reumatismo. Nestes trabalhos, o alelo T foi significativamente associado com lesão discóide e com a progressão do reumatismo para artrite reumatóide. Foi também observado por Pawlik et al. (2005) e Cantagrel et al. (1999), num trabalho com pacientes portadores de artrite reumatóide, que o alelo T, genotipicamente CT ou TT estava significativamente mais presente nesses pacientes .

Observando os resultados do presente estudo referentes ao polimorfismo *IL4* -590CT, em que houve uma diferença estatisticamente relevante com predomínio do alelo T nos pacientes portadores de PTI, podemos igualmente sugerir que este alelo desempenha um papel de risco.

Um segundo polimorfismo do gene *IL4* já citado, estudado em outras doenças autoimunes é o *IL4* intron 3 VNTR. As repetições de 70 pb podem codificar 3 alelos. Dentre eles, um alelo muito raro com uma única repetição de 114pb (Hegab et al., 2004). Poucos trabalhos demonstram a presença do mesmo, sendo mais comum somente a presença do alelo 1 – *IL4* \*1 (254 pb) e do alelo 2- *IL4* \*2 (184 pb).

Alguns estudos mostram evidências de que o *IL4* \*2 (184 pb) está relacionado a alta expressão de IL-4 e que o mesmo pode ser visto como fator de proteção em algumas doenças (Nakashima et al., 2002; Vandebroek et al., 1997). Contudo, em

estudo de pacientes com artrite reumatóide foi observada uma associação significativa entre portadores do *IL4* \*2 (184 pb) e esta doença na população francesa caucasiana (Cantagrel et al., 1999). De acordo com alguns trabalhos este polimorfismo contribuiu para destruição severa das articulações em artrite reumatóide (Buchs et al., 2000) e também está associado com a doença de Graves (Hunt et al., 2000) e esclerose múltipla (Vandenbroeck et al., 1997).

Wu et al., (2005) em seu trabalho com crianças chinesas portadoras de PTI crônica demonstrou significativamente menor frequência do genótipo heterozigoto 1.2 e do *IL4* \*1 (254 pb) em seu grupo de portadores de PTI quando comparadas a um grupo controle. Em 2007, Chen et al., também na China, concluiu que o polimorfismo *IL4* intron 3 VNTR está distribuído similarmente entre pacientes chineses portadores de PTI e controles, e portanto pode não estar relacionado com a susceptibilidade a PTI. No atual estudo envolvendo a população adulta de portadores de PTI na região de Campinas, SP é sugerido que o *IL4* \*1 (254 pb) esteja associado a um risco aumentado para o desenvolvimento da doença, ou mesmo que o *IL4* \*2 seja um fator de proteção. Este resultado propõe que o *IL4* \*1 relacionado ao fenótipo baixo produtor pode favorecer as manifestações autoimunes e então aumentar a susceptibilidade a doença, já que a ação anti-inflamatória desta citocina deve ser menor na presença de *IL4* \*1.

No atual estudo, podemos observar que os resultados referentes aos dois polimorfismos de *IL4* são divergentes, pois o primeiro (*IL4* -590C/T) sugere que o fenótipo alto produtor desempenhe um papel de risco, e o segundo (*IL4* intron 3 VNTR) sugere que o fenótipo alto produtor desempenhe um papel de proteção. A atribuição ao alelo T do polimorfismo *IL4* -590C/T e ao alelo 2 do polimorfismo *IL4* intron 3 VNTR como codificadores de alta produção é baseada em dosagens da IL-4

em indivíduos portadores dos respectivos alelos e, portanto pode variar dependendo das condições ambientais envolvidas e características locais da população estudada. A falta de um estudo mostrando os diferentes efeitos na transcrição do gene em modelos *in vitro* e que permite avaliar os padrões de secreção ligados ao fator genético, dificulta a associação real, livre de interferências do meio, entre os polimorfismos do gene *IL4* e níveis séricos da citocina.

Sendo assim, os resultados opostos relacionados aos dois polimorfismos do gene *IL4* encontrados neste estudo, bem como resultados divergentes observados na literatura, podem ter ocorrido devido a estas variações.

A IL-6 é uma citocina liberada pelos macrófagos, indutora de uma ampla variedade de respostas precoces na infecção. Ela desencadeia a diferenciação terminal das células B em plasmócitos e aumenta a secreção de imunoglobulinas específicas pelos linfócitos B. Também foi evidenciado que os plasmócitos continuam a proliferar se estimulados pela IL-6 evidenciando a atividade relacionada desta citocina à produção de anticorpos e à resposta imune humoral (Huang et al., 1999). A IL-6 ainda possui atividade relacionada com a resposta da fase aguda, através de estimulação da resposta aguda hepática frente a infecções e/ou lesões, diferenciação e/ou ativação de macrófagos e células T, além de estímulo e suporte à hematopoiese (Terry et al., 2000). A regulação de seus níveis séricos além de estar associado a estímulos indutores desencadeados por IL-1 e TNF também pode estar sob controle genético, principalmente por meio de polimorfismos.

Em 1998, Olomolaiye et al., descreveu um polimorfismo na posição -174 na região promotora do gene IL-6 onde a troca de uma guanina (G) por uma citosina (C) está associada com uma redução dos níveis séricos de IL-6 em indivíduos sadios.

Utilizando-se de um experimento de transfecção transitória de células HeLa com construção contendo os diferentes alelos na posição -174 da região 5', Fishman et al. (1998) demonstraram que o polimorfismo *IL6* -174 G/C altera a resposta de transcrição frente a estímulos (LPS e IL-1) e que o alelo C representa a forma de baixa resposta.

Recentemente trabalhos envolvendo portadores de LES e o polimorfismo *IL6*-174G/C encontraram uma predominância do alelo -174G em sua população de estudo quando comparadas à população saudável (Lee YH LH, Choi SJ, Ji JD, Song GG., 2012). Já em uma população polonesa com esclerose múltipla houve associação de homozigotos CC com risco aumentado para a doença (Mirowska-Guzel et al., 2011).

Em pacientes portadores de PTI na Turquia, nenhum tipo de associação entre este polimorfismo e a doença foi encontrado (Pehlivan et al. 2011), assim como no atual estudo, onde as freqüências polimórficas permaneceram sem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de portadores de PTI e o grupo controle.

Considerando as diferenças étnicas e as freqüências do polimorfismo *IL6* -174 G/C em diversas populações mundiais, foi observada que a freqüência do alelo C difere bastante entre elas. Em afro-caribenhos esta freqüência é de 5%, já em Europeus ela é maior que 50% (Sie et al., 2006) em nossa população é de 24,4% e em coreanos este alelo não é observado (Jeon et al.). Isto sugere que a associação entre doença e o polimorfismo pode ser diferentemente dependente da freqüência de seus genótipos em diferentes grupos étnicos.

A IL-10 é uma citocina imunorregulatória que é principalmente produzida por linfócitos Th2, linfócitos B e macrófagos (Munshi et al.). Sua função principal é inibir os macrófagos ativados e, assim, manter o controle homeostático das reações imunes inatas e mediadas por células. Ela exerce seu efeito anti-inflamatório por meio da inibição da síntese de citocinas pró inflamatórias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF $\alpha$  nos macrófagos ativados (Hart et al., 1995). Além disso ela também bloqueia a ação das citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentando a liberação de IL1R-a solúvel (Cassatella et al., 1994). Contrariamente a esta ação anti-inflamatória, a IL-10 promove respostas de células B por funcionar como fator de crescimento destas células e por inibição das células T *helper* (Th1). Associado a estas ações, a IL-10 atua nas células B dos centros germinativos aumentando a expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* (linfoma de células B2), prevenindo deste modo a apoptose de células B auto-reativas sendo, portanto um facilitador das manifestações auto-imunes (Lazarus et al., 1997; Moore et al., 2001).

O gene da IL-10 (*IL10*) é codificado por 5 exons no cromossomo 1 e vários polimorfismos têm sido descritos com 5 SNPs e vários VNTRs ou microssatélites, resultando em vários haplótipos conservados. A importância dos haplótipos é vista quando o efeito de um único SNP não está presente sozinho ou não é forte o suficiente para caracterizar um distúrbio. Desta maneira a interação gene-gene pode ser considerada para caracterização e identificação de susceptibilidade de genes para risco da doença.

Foi demonstrado por Turner et al. (1997) que estes polimorfismos desencadeiam variável expressão do gene. O haplótipo -1082G/-819C/-592C está associado com maior produção e o -1082A/-819T/-592A com menor produção de IL-10 (Suarez et al., 2003), determinando 3 fenótipos possíveis: Alto produtor

(GCC/GCC), Médio produtor (GCC/ACC e GCC/ATA) e Baixo produtor (ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA). Estas diferenças e a capacidade de produção diferenciada têm sido relacionada com a ocorrência, proteção, gravidade e resposta à terapêutica de algumas doenças (Crawley et al., 1999; Rosado et al., 2008; Sun et al.). Alguns estudos demonstram a influência de haplótipos de *IL10* -1082, -592, -819 GCC/GCC na ocorrência e maior incidência da doença de enxerto contra o hospedeiro (DECH) (Socie et al., 2001) e outros associam o haplótipo -1082A/-592T/-819A com o risco aumentado de DECH crônica, embora em pacientes de diferentes origens étnicas (Kim et al., 2005). Em um estudo realizado nas Ilhas Canárias, Espanha, com pacientes portadores de LES foi sugerido que o haplótipo codificador de altos níveis desta citocina está associado a esta doença nestes pacientes (Rosado et al., 2008). Também, Crawley et al., (1999) concluiu em um de seus trabalhos a significância funcional do haplótipo -1082A/-592T/-819A e associou a ele um risco aumentado para o desenvolvimento da oligoartrite extendida. Em uma meta-análise Zhang et al. (2011) sugeriu que pacientes carreadores do alelo G para o polimorfismo *IL10* -1082A/G tinham menos riscos de desenvolverem artrite reumatóide.

Na população japonesa adulta diagnosticada com PTI, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparou-se genótipos e haplótipos de pacientes com a população saudável (Saitoh et al., 2011). Em adição, Sarpatwari et al. (2011) demonstrou que, isoladamente, a frequência dos polimorfismos *IL10* -592C/A e *IL10* -819C/T em pacientes portadores de PTI não apresentam nenhuma diferença estatisticamente significativa quando comparados à população saudável caucasiana inglesa. Também, segundo Pehlivan (2011), a ausência de um resultado estatisticamente significativo para a comparação entre as frequências de pacientes portadores de PTI e controles para os polimorfismos *IL10* (-1082, -819 e -512)

sugere que os polimorfismos deste gene podem não estar relacionados com a PTI e sua susceptibilidade.

No atual estudo, o haplótipo codificador de altos níveis de IL-10 demonstrou-se significativamente mais presente no grupo de portadores de PTI do que no grupo controle, assim como em estudos anteriores envolvendo outras doenças auto-imunes. Tendo em vista que algumas citocinas podem ser pró ou anti-inflamatórias de acordo com o sistema celular envolvido, este resultado reflete a ação inflamatória que pode ser promovida por IL-10 ao estimular a proliferação de células B. O estudo de cada um dos três polimorfismos isoladamente é similar aos realizados nas populações turca e inglesa e não evidencia qualquer relação entre estes polimorfismos e a ocorrência de PTI.

### **Equilíbrio de Hardy-Weinberg**

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população em estudo foi calculado para cada um dos grupos considerando as frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos. Embora para a maioria deles o equilíbrio tenha se mantido, em dois polimorfismos (*IL1RN* intron 2 VNTR e *IL4* -590C/T) ele não foi observado, eventualmente pela possibilidade de haver uma força seletiva, no grupo de portadores de PTI, que pudesse comprometer o equilíbrio. No grupo controle, o desequilíbrio pode ter sido observado pelo tamanho amostral, que provavelmente foi inferior ao ideal para o cálculo deste equilíbrio em tais polimorfismos.

## Contagem de plaquetas e polimorfismo gênico

Estudos demonstram que contagem de plaquetas menores que 20.000/mm<sup>3</sup> pode predispor a sangramentos independentes de qualquer trauma e que estes sangramentos espontâneos podem ser fatais dependendo da sua localização e intensidade da hemorragia. Em PTI, tanto a destruição plaquetária quanto a sua produção comprometida podem contribuir para a trombocitopenia observada nos pacientes (Stoll et al., 1985).

Recentemente, Saitoh et al. (2011) associou polimorfismos do gene *IL10* com a severidade da trombocitopenia em pacientes adultos portadores de PTI no Japão e esta severidade foi definida como a contagem de plaquetas inferior a 10.000/mm<sup>3</sup>. Em seu trabalho foi sugerido que o haplótipo codificador de baixa produção (-1082A/-592T/-819A) estava significativamente mais presente nos pacientes portadores de PTI com plaquetas abaixo de 10.000/mm<sup>3</sup> do que nos pacientes controles. Sabemos que a IL-10 está associada a uma inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, sendo assim, um fenótipo de baixa produção pode estar relacionado a um menor efeito anti-inflamatório da IL-10 e por isso estar associado a uma maior destruição plaquetária.

No atual estudo, o valor considerado crítico para o risco aumentado de sangramento foi de 20.000/mm<sup>3</sup> e para os polimorfismos *IL1* -511C/T, *IL1* +3953C/T, *IL1RN* intron2 VNTR, *IL4* intron 3 VNTR, *IL4* -590C/T, *IL6* -176G/C, *IL10* -1082G/A, *IL10* -819C/T, *IL10* -592A/C bem como para os haplótipos de *IL10*, não foi possível identificar nenhuma associação. Esta diferença entre os resultados deste estudo e aquele realizado por Saitoh et al., (2011) no Japão pode ter ocorrido pela diferença no número mínimo de plaquetas considerado crítico ou mesmo por diferenças regionais e étnicas de distribuições dos polimorfismos.

## Resposta à terapêutica

Estudos sugerem existir uma base genética para a ocorrência da PTI, que tem sido identificada com frequência em gêmeos monozigóticos e em certos grupos familiares nos quais existe uma maior tendência para a produção de autoanticorpos. Alguns grupos étnicos afetados apresentam maior prevalência de alelos HLA-DRw2 e DRB1\*0410. A resposta terapêutica diferenciada dos pacientes também mostra a importância genética na PTI. Por exemplo, o perfil de alelos HLA-DR4 tem evolução desfavorável sob corticoterapia, enquanto o perfil DRB1\*0410 tem prognóstico favorável; o perfil de alelos HLA-DRB1\*1501 tem pior resposta à esplenectomia. Contudo, apesar dessas observações, poucos estudos mostram de forma consistente a ligação causal entre PTI e o complexo MHC (Cines e Blanchette, 2002; Wang et al., 2006).

Saitoh et al. (2011) em seu estudo com pacientes portadores de PTI não observou diferenças significativas na associação entre haplótipos de *IL10* e respostas clínicas ao tratamento como uso de corticóides e esplenectomia. Já Pehlivan et al. (2011) também num estudo com pacientes portadores de PTI associou os genótipos *TNFA* -308AG e MBL AB (do gene da Lectina Ligante de Manose) a uma boa resposta ao tratamento com esteróides, porém o mesmo não foi observado quando analisados os haplótipos de *IL-10* e o polimorfismo *IL6* -174G/C.

No atual estudo, foi observada uma associação entre o polimorfismo *IL1B* -511C/T e a resposta à esplenectomia. Os resultados sugerem que o genótipo *IL1B* -511CC possa ser um fator de importância e que há uma tendência dos pacientes portadores deste genótipo de responderem bem a esse tipo de tratamento. O *IL1B* -511CC caracteriza um genótipo de baixa produção de IL-1beta, desta maneira um paciente portador deste genótipo pode apresentar um status inflamatório mais baixo,

o que justifica a esplenectomia ser uma terapêutica suficiente para inibir a resposta imune. Ao contrário, em um paciente fenotipicamente hiper-reativo inflamatório a esplenectomia provavelmente não levaria a uma imunossupressão suficiente para elevar a contagem do número de plaquetas a um nível significativo para uma boa resposta. Este resultado, porém, encontra-se em uma condição limítrofe ( $p=0,05$ ;  $OR=inf$ ;  $IC=0,94$  a  $inf$ ), talvez pelo tamanho amostral (57 pacientes esplenectomizados) que pode não ter sido suficientemente grande para caracterizar a população em estudo. Desta maneira, este resultado deve ser confirmado em uma análise envolvendo uma população maior submetida à esplenectomia.

Atualmente, muito tem sido feito a fim de sugerir alternativas às terapêuticas tradicionais. Um dos estudos mais recentes foi realizado na China por Xiao et al. (2012) com transplante de células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos (ADSCs) em modelos murinos portadores de PTI. As ADSCs são células imunomoduladoras que são capazes de regular células Th e induzir efeitos terapêuticos em doenças auto-imunes. Neste estudo foi observado que o número de plaquetas em ratos com PTI aumentou significativamente após o tratamento com ADSCs e demonstrou a eficácia deste tratamento em modelo murino.

A capacidade em detectar polimorfismos do DNA vem modificando os estudos de genética humana. Um dos maiores impactos da detecção de polimorfismos do DNA tem sido o seu emprego para analisar marcadores para mapeamento, clonagem e identificação de genes causadores de doenças. O objetivo principal é identificar a variação de seqüência do DNA que cause ou contribua para um fenótipo específico. Contudo, o desafio maior é identificar polimorfismos e empregá-los para esclarecer os componentes genéticos de doenças humanas complexas.

Muitos estudos envolvendo polimorfismos e susceptibilidade à doenças apresentam resultados controversos. Não devemos, entretanto, nos mostrar surpresos, pois resultados discordantes são comuns entre investigações genéticas em doenças complexas. Explicações possíveis para isto incluem heterogeneidade clínica, diferenças étnicas, reais heterogeneidade genéticas e tamanho amostral. Sendo assim, o estudo atual tem grande relevância, pois nos permite conhecer melhor o perfil gênico dos pacientes portadores de PTI na região de Campinas- SP e possivelmente inferir uma tendência de resposta à intervenção cirúrgica como a esplenectomia através do estudo do polimorfismo do gene *IL1B* -511C/T. Para maior compreensão, outros polimorfismos envolvendo citocinas não abordados aqui, poderiam ser incluídos num outro estudo complementando as informações fornecidas por este trabalho.

## **CONCLUSÕES**



1. Genótipos com a ausência do *IL1RN* \*2 estão significativamente aumentados no grupo de pacientes portadores de PTI e conferem uma situação de risco para o desenvolvimento da doença;
2. Para os polimorfismos da IL-4 (*IL4* -590C/T e *IL4* intron 3 VNTR) o alelo *IL4* -590T e o alelo *IL4* \*1 apresentaram-se como fator de risco para o desenvolvimento da doença;
3. A presença do haplótipo Alto Produtor *IL10* -1082, -819, -592 GCC/GCC mostrou-se significativamente mais alto nos pacientes portadores de PTI e conferem uma situação de risco para o desenvolvimento da doença;
4. Existe uma tendência dos pacientes portadores do genótipo *IL1* -511CC de apresentarem uma resposta positiva à esplenectomia.



## **REFERÊNCIAS**



Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Text and Review Series 1997; Philadelphia: 3. Ed, p.494.

Abrahamson PE, Hall SA, Feudjo-Tepie M, Mitrani-Gold FS, Logie J. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review. *Eur J Haematol* 2009; 83 (2): 83-9.

Addas-Carvalho M, de Paula EV, Lima CS, Saad ST. Polymorphisms of interleukin-1 gene complex, IL6 and tumour necrosis factor genes in chronic idiopathic neutropenia of adults. *Ann Hematol* 2005; 84 (11): 709-14.

Addas-Carvalho M, Salles TS, Saad ST. The association of cytokine gene polymorphisms with febrile non-hemolytic transfusion reaction in multitransfused patients. *Transfus Med* 2006; 16 (3): 184-91.

Akin M, Turgut S, Ayada C, Polat Y, Balci YI, Erdogan F. Relation between 3435C>T multidrug resistance 1 gene polymorphism with high dose methylprednisolone treatment of childhood acute idiopathic thrombocytopenic purpura. *Gene* 487 (1): 80-3.

Amorim DM, Silveira Vda S, Scrideli CA, Queiroz RG, Tone LG. Fcγ receptor gene polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 34 (5): 349-52.

Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13 (4-5): 323-40.

Atabay B, Oren H, Irken G, Kizildag S, Tunali S, Turker M, et al. Role of transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25 (11): 885-9.

Bioque G, Crusius JB, Koutroubakis I, Bouma G, Kostense PJ, Meuwissen SG, et al. Allelic polymorphism in IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995; 102 (2): 379-83.

Buchs N, Silvestri T, di Giovine FS, Chabaud M, Vannier E, Duff GW, et al. IL-4 VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection against destruction. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39 (10): 1126-31.

Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (6): 1093-100.

Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, Calzetti F, Bonora S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med* 1994; 179 (5): 1695-9.

- Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002; 346 (13): 995-1008.
- Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (6): 1101-8.
- Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995; 99 (2): 303-10.
- De Carli M DEM, Zancuoghi G, Romagnani S, Del Prete G. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, regulation of development and role in autoimmunity. *Autoimmunity* 1994; 18 (4): 301-8.
- di Giovine FS TE, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). *Hum Mol Genet* 1992; 1 (6): 450.
- Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8 (4): 253-65.
- Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 328 (2): 106-13.
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404 (6776): 398-402.
- Feldman T. Replacement of central vascular catheters. *N Engl J Med* 1993; 328 (6): 445; author reply 46.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102 (7): 1369-76.
- Fogarty PF. Chronic immune thrombocytopenia in adults: epidemiology and clinical presentation. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23 (6): 1213-21.
- Foster CB, Zhu S, Erichsen HC, Lehrnbecher T, Hart ES, Choi E, et al. Polymorphisms in inflammatory cytokines and Fc gamma receptors in childhood chronic immune thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Br J Haematol* 2001; 113 (3): 596-9.
- Garcia-Gonzalez MA, Lanás A, Santolaria S, Crusius JB, Serrano MT, Pena AS. The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. *Clin Exp Immunol* 2001; 125 (3): 368-75.
- Godeau B, Provan D, Bussel J. Immune thrombocytopenic purpura in adults. *Curr Opin Hematol* 2007; 14 (5): 535-56.

Gorgi Y SI, Goucha R, Aouadi H, Amri M, Makhoulouf M, Ben Romdhane T, Cherif M, Jendoubi-Ayed S, Ben Abdallah T, Ayed K. [IL1/IL1 Ra, CTLA-4 and Apo1/Fas genes polymorphisms and susceptibility to IgA nephropathy in Tunisian patients]. *Tunis Med.* 2010; 88 (11): 789-93

Hart PH, Jones CA, Finlay-Jones JJ. Monocytes cultured in cytokine-defined environments differ from freshly isolated monocytes in their responses to IL-4 and IL-10. *J Leukoc Biol* 1995; 57 (6): 909-18.

Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, et al. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. *Chest* 2004; 126 (6): 1832-9.

Huang D, Zheng C, Giscombe R, Matell G, Pirskanen R, Lefvert AK. Polymorphisms at - 174 and in the 3' flanking region of interleukin-6 (IL-6) gene in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 1999; 101 (2): 197-200.

Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bell JI, Wass JA, Welsh KI. Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85 (5): 1984-8.

Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol* 1998; 28 (8): 2598-602.

Jeon JY, Kim HA, Kim SH, Park HS, Suh CH. Interleukin 6 gene polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in Koreans. *J Rheumatol* 37 (11): 2251-8.

Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y, Kuromaru R, Ihara K, Kaku Y, et al. Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (6): 1298-300.

Karimi M GL, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet* 2009; 17 (11): 1454-62.

Kim DH, Lee NY, Sohn SK, Baek JH, Kim JG, Suh JS, et al. IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation* 2005; 79 (11): 1615-22.

Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, et al. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24 (12): 2314-7.

Lee YH BS, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The association between interleukin-6 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Inflamm Res.* 2012; 61 (7): 665-71.

Lee YH LH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The association between interleukin-6 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus* 2012; 21 (1): 60-7.

Lo D, Freedman J, Hesse S, Brinster RL, Sherman L. Peripheral tolerance in transgenic mice: tolerance to class II MHC and non-MHC transgene antigens. *Immunol Rev* 1991; 122: 87-102.

Ma P, Chen D, Pan J, Du B. Genomic polymorphism within interleukin-1 family cytokines influences the outcome of septic patients. *Crit Care Med* 2002; 30 (5): 1046-50.

Maksymowych WP, Suarez-Almazor ME, Buenviaje H, Cooper BL, Degeus C, Thompson M, et al. HLA and cytokine gene polymorphisms in relation to occurrence of palindromic rheumatism and its progression to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29 (11): 2319-26.

Mirowska-Guzel D GG, Mach A, Czlankowski A, Czlankowska A. Association of IL1A, IL1B, ILRN, IL6, IL10 and TNF- $\alpha$  polymorphisms with risk and clinical course of multiple sclerosis in a Polish population. *J Neuroimmunol*. 2011; 236 (1-2): 87-92.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.

Mosmann TR FT. Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods*. 1989; 116 (2): 151-8.

Munshi A, Rajeshwar K, Kaul S, Al-Hazzani A, Alshatwi AA, Sai Babu M, et al. Interleukin-10-1082 promoter polymorphism and ischemic stroke risk in a South Indian population. *Cytokine* 52 (3): 221-4.

Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Akahoshi M, Tanaka Y, et al. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun* 2002; 3 (2): 107-9.

Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Maki T, Miyamoto T, et al. Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156 (5): 1390-3.

Nugent DJ. Childhood immune thrombocytopenic purpura. *Blood Rev* 2002; 16 (1): 27-9.

Ogawara H, Handa H, Morita K, Hayakawa M, Kojima J, Amagai H, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2003; 71 (4): 283-8.

Olsson B, Andersson PO, Jernas M, Jacobsson S, Carlsson B, Carlsson LM, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 2003; 9 (9): 1123-4.

Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, et al. Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 (1): 91-4.

Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B, Herczynska M. The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2005; 26 (1): 48-51.

Pehlivan M, Okan V, Sever T, Balci SO, Yilmaz M, Babacan T, et al. Investigation of TNF-alpha, TGF-beta 1, IL-10, IL-6, IFN-gamma, MBL, GPIIb/IIIa, and IL1A gene polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Platelets* 2011; 22 (8): 588-95.

Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22 (6): 396-402.

Rocha AM, De Souza C, Rocha GA, De Melo FF, Saraiva IS, Clementino NC, et al. IL1RN VNTR and IL2-330 polymorphic genes are independently associated with chronic immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 150 (6): 679-84.

Rosado S, Rua-Figueroa I, Vargas JA, Garcia-Laorden MI, Losada-Fernandez I, Martin-Donaire T, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands. *Int J Immunogenet* 2008; 35 (3): 235-42.

Rosenwasser LJ. Interleukin-4 and the genetics of atopy. *N Engl J Med* 1997; 337 (24): 1766-7.

Saitoh T, Kasamatsu T, Inoue M, Mitsui T, Koiso H, Yokohama A, et al. Interleukin-10 gene polymorphism reflects the severity of chronic immune thrombocytopenia in Japanese patients. *Int J Lab Hematol* 2011; 33 (5): 526-32.

Saitoh T, Koiso H, Mitsui T, Yokohama A, Handa H, Karasawa M, Ogawara H, Nojima Y, Murakami H. Interleukin-17F gene polymorphism in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2011; 87 (3): 253-8.

Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN\*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol* 1998; 47 (3): 195-8.

Sarpawari A, Bussell JB, Ahmed M, Erqou S, Semple JW, Newland AC, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis demonstrates a significant association of tumour necrosis factor-alpha (TNFA) with primary immune thrombocytopenia among Caucasian adults. *Hematology* 16 (4): 243-8.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Jr., Line SR. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol* 2003; 30 (4): 341-5.

Seckinger P, Dayer JM. Interleukin-1 inhibitors. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1987; 138 (3): 486-8.

Semple JW. Immunobiology of T helper cells and antigen-presenting cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr Suppl* 1998; 424: 41-5.

Semple JW. Immune pathophysiology of autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood Rev* 2002; 16 (1): 9-12.

Semple JW, Freedman J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1991; 78 (10): 2619-25.

Semple JW, Freedman J. Abnormal cellular immune mechanisms associated with autoimmune thrombocytopenia. *Transfus Med Rev* 1995; 9 (4): 327-38.

Shih CM, Lee YL, Chiou HL, Chen W, Chang GC, Chou MC, et al. Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 52 (1): 15-20.

Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today* 2000; 21 (2): 60-4.

Sie MP, Sayed-Tabatabaei FA, Oei HH, Uitterlinden AG, Pols HA, Hofman A, et al. Interleukin 6 -174 g/c promoter polymorphism and risk of coronary heart disease: results from the rotterdam study and a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26 (1): 212-7.

Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20 (1): 43-59.

Socie G, Loiseau P, Tamouza R, Janin A, Busson M, Gluckman E, et al. Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001; 72 (4): 699-706.

Sood R, Wong W, Jeng M, Zehnder JL. Gene expression profile of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47 (5 Suppl): 675-7.

Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost* 2008; 99 (1): 4-13.

Stevens W, Koene H, Zwaginga JJ, Vreugdenhil G. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: present strategy, guidelines and new insights. *Neth J Med* 2006; 64 (10): 356-63.

Stoll D, Cines DB, Aster RH, Murphy S. Platelet kinetics in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and moderate thrombocytopenia. *Blood* 1985; 65 (3): 584-8.

Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003; 75 (5): 711-7.

Sun FB, Zhang DL, Zheng HM, Song B. [Association of interleukin-10 gene polymorphism with cachexia in patients with gastric cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 32 (11): 845-9.

Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993; 91 (4): 403-4.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275 (24): 18138-44.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24 (1): 1-8.

Vamvakopoulos JE. Multiplex universal genotyping using a modified ARMS-PCR protocol. *Biotechniques* 2002; 33 (5): 1110-2.

Vandenbroeck K, Martino G, Marrosu M, Consiglio A, Zaffaroni M, Vaccargiu S, et al. Occurrence and clinical relevance of an interleukin-4 gene polymorphism in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997; 76 (1-2): 189-92.

Vangsted AJ NK, Klausen TW, Haukaas E, Tjønneland A, Vogel U. A functional polymorphism in the promoter region of the IL1B gene is associated with risk of multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2012; 158 (4): 515-8.

Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89 (9): 4076-80.

Wang TT, Zhao H, Ren H, Guo JH, Xu MQ, Yang RC, et al. [Profiles of type 1 and type 2 T cells in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86 (10): 669-73.

Wu KH, Peng CT, Li TC, Wan L, Tsai CH, Lan SJ, et al. Interleukin 4, interleukin 6 and interleukin 10 polymorphisms in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2005; 128 (6): 849-52.

Wu KH, Peng CT, Li TC, Wan L, Tsai CH, Tsai FJ. Interleukin-1beta exon 5 and interleukin-1 receptor antagonist in children with immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29 (5): 305-8.

Wu MC, Huang CM, Tsai JJ, Chen HY, Tsai FJ. Polymorphisms of the interleukin-4 gene in chinese patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Lupus* 2003; 12 (1): 21-5.

Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, et al. The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Cytokine* 56 (2): 351-5.

Zheng C, Huang DR, Bergenbrant S, Sundblad A, Osterborg A, Bjorkholm M, et al. Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2000; 109 (1): 39-45.

Zheng GH CH, Xiong SQ. Polymorphisms of -174G>C and -572G>C in the interleukin 6 (IL-6) gene and coronary heart disease risk: a meta-analysis of 27 research studies. *PLoS One*. 2012; 7 (4): e34839.

Zhou B, Zhao H, Yang RC, Han ZC. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 54 (2): 107-16.

Zhuang W WX, Zhou Y, Liu L, Liu GJ, Wu TX, Yao X, Du L, Wei ML. Interleukin10 - 592 promoter polymorphism associated with gastric cancer among Asians: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Dig Dis Sci*. 2010; 55 (6): 1525-32.

## **ANEXOS**



## Anexo 1: Termo de Consentimento livre e esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

**Título do Projeto:** INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA INTERLEUCINA-1 (IL-1), IL1RN, IL-4, IL-6 E IL-10 EM PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE.

Responsáveis pelo Projeto: Josie Fadul Vilela  
Prof. Dr. Marcelo Addas Carvalho

Voluntário: \_\_\_\_\_, idade: \_\_\_\_\_  
RG: \_\_\_\_\_, HC: \_\_\_\_\_, residente à RUA/AV. \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_, e-mail: \_\_\_\_\_

Responsável pelo voluntário: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Documento comprobatório de responsabilidade: \_\_\_\_\_

Residente à RUA/AV. \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_, e-mail: \_\_\_\_\_

3. Os objetivos deste projeto são avaliar o perfil genético dos pacientes portadores de PTI e a resposta a tratamentos imunossupressores relacionando-os com os polimorfismos genéticos estudados.
- Serão coletados 16mL de sangue para análise genética. Os riscos a que o senhor(a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá ao voluntário outro tipo de riscos. O benefício esperado na sua participação será contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos da doença, assim como o desenvolvimento de novas estratégias para seu diagnóstico precoce, tratamento e seguimento.

#### **Informações adicionais:**

1. Eventualmente, o senhor (a) poderá ser reconvocato a comparecer ao Hemocentro, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame. Neste caso, haverá reembolso de gastos com transporte, em consequência de convocação exclusivamente para a pesquisa.
2. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer momento, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor(a) concorda que este material possa ser armazenado.
5. Caso seja realizado um outro estudo com este material, o senhor(a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo deverá ser novamente submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).
6. Todas as informações obtidas pelo estudo terão caráter sigiloso, onde serão utilizadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, mantendo sua identidade preservada.

7. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

8. Será entregue ao voluntário, cópia deste termo de consentimento.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: (19) 3788.8936)

Concordo em participar do presente estudo, de avaliação da associação entre trombose venosa e inflamação, após estar absolutamente esclarecido(a) dos propósitos do mesmo.

Campinas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_

---

Assinatura do voluntário ou responsável legal

---

Josie Fadul Vilela  
Pós-graduanda responsável pelo projeto

---

Prof.Dr. Marcelo Addas Carvalho  
Orientador do projeto

## Anexo2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 15/05/08.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 083/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0061.0.146.000-08

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** "ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DE INTERLEUCINA-1 (IL-1), IL-4, IL-6 E IL-10 COM A RESPOSTA CLÍNICA DE PACIENTES COM PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNOLÓGICA".

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Josie Fadul Vilela

**INSTITUIÇÃO:** Centro de Hematologia e Hemoterapia/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 04/03/2008

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 22/04/09 (O formulário encontra-se no site acima)

### II - OBJETIVOS

Determinar a frequência dos polimorfismos dos genes das interleucinas 1, 4, 6 e 10 em indivíduos com diagnóstico de PTL, comparando com a frequência na população geral da cidade de Campinas.

### III - SUMÁRIO

Serão convidados a participar deste estudo pacientes atendidos no complexo hospitalar da UNICAMP, com diagnóstico de PTL, não associada a doenças auto-imunes sistêmicas (portanto, PTL idiopática). O grupo controle será constituído por 100 doadores voluntários, de sangue, do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP, após autorização e assinatura de termo de consentimento padrão para esse tipo de doador. Este grupo é composto de doadores não relacionados para os polimorfismos *IL-1B* -511C/T; *IL-1B* +3953C/T; *IL-1RN* intron 2 VNTR; *IL-4* -590C/T; *IL-4* intron 3 VNTR; *IL-6* -174G/C; *IL-10* -1082G/A; *IL-10* -819C/T e *IL-10* -592C/A.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de abril de 2008.

*Prof. Dra. Carpien Sílvia Bertuzzo*  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

**Anexo 3:** Formulário para obtenção de informações clínicas

Sexo	Masc.	Fem.
------	-------	------

Nome : \_\_\_\_\_

HC : \_\_\_\_\_

Data Nascimento : \_\_\_\_\_

Data Diagnóstico : \_\_\_\_\_

PTI  Primária  Secundária

Doenças associadas : \_\_\_\_\_

Contagem de plaquetas ao diagnóstico : \_\_\_\_\_ / mm<sup>3</sup>

Tratamentos / Resposta :

<input type="checkbox"/>	Corticoterapia VO	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Corticoterapia EV	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Imunoglobulina	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Esplenectomia	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Dapsona	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Rituximab	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Outras	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não

Tempo de Resposta

Corticoterapia :	_____	<input type="checkbox"/>	Dias	<input type="checkbox"/>	Meses
Imunoglobulina :	_____	<input type="checkbox"/>	Dias	<input type="checkbox"/>	Meses
Esplenectomia :	_____	<input type="checkbox"/>	Dias	<input type="checkbox"/>	Meses

Status na Avaliação

- RC (  $\geq 150.000 / \text{mm}^3$  )
- RP (  $50.000 - 150.000 / \text{mm}^3$  )
- Recaída
- Refratária / Sem resposta



**ANEXO 4: Resposta clínica à CORTICOTERAPIA e padrão polimórfico associado a ela.**

CORTICOTERAPIA		POLIMORFISMO											
RESPOSTA POSITIVA	IL1RM IL1B+3953CT IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA						
PTI 53	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	TT	2.2	CT	GC	CC	AG			AG	
PTI 246	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AA			AA	GG
PTI 73	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	2.2	CC	CT	1.2	TT	GC	AC	AA			AA	GA
PTI 204	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	3.3	CT	CC	1.1	CT	GC	CC	GG			GG	GG
PTI 100	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AA	AA			AA	AA
PTI 60	respondeu a corticoterapia VD- corticodep	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AA			AA	GA
PTI 51	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG			AG	GG
PTI 48	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	TT	CT	1.1	CT	GG	CC	GG			GG	GG
PTI 249	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	2.2	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AG			AG	GA
PTI 196	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	3.3	TT	CC	1.1	CT	GC	CC	AG			AG	GG
PTI 116	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	AC	AG			AG	GA
PTI 79	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.4	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA			AA	GG
PTI 75	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG			AG	GA
PTI 70	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	CC	1.1	TT	GC	CC	GG			GG	GG
PTI 58	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AA			AA	GG
PTI 39	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	CT	2.2	CT	GG	CC	AA			AA	GG
PTI 5	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CT	TT	1.2	CT	GG	AA	AA			AA	AA
PTI 18	respondeu a corticoterapia VO- corticodep		CT	CT	1.2	CT	GC	AC	AA			AA	AA
PTI 59	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CT	CT	1.2	TT	GG	AC	AA			AA	AA
PTI 27	respondeu a corticoterapia VO- corticodep		CT	CT	1.1	TT	GC	CC	AG			AG	AG
PTI 107	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	2.2	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	AA			AA	GG
PTI 175	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	CC	GG			GG	GG
PTI 214	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG			AG	GA
PTI 52	respondeu a corticoterapia VD- corticodep	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG			AG	GA
PTI 50	respondeu a corticoterapia VO- corticodep	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	AG			AG	GG
PTI 1	respondeu a corticoterapia VD- corticodep	1.1	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AA			AA	GA
PTI 312	respondeu a corticoterapia VD- corticodep	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AA			AA	GA
PTI 91	respondeu a corticoterapia após esplenecto	1.1	CC	CT	2.2	CT	GC	CC	AG			AG	GG

CORTICOTERAPIA		POLIMORFISMO									
RESPOSTA POSITIVA		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AGIL	10-819GA	
PTI 241	respondeu a corticoterapia VD- corticoidep	3.3	CT	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 45	respondeu a corticoterapia VO- corticoidep		CT	CT	1.1	TT	GG	CC	AG		
PTI 237	respondeu a corticoterapia VD- corticoidep	2.2	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 11	respondeu a corticoterapia VD- corticoidep	1.1	CT	TT	1.2	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 8	respondeu a corticoterapia VD- corticoidep		CT	CT	1.1	CT	GG	CC	AG		
PTI 64	respondeu a corticoterapia VD- corticoidep		CT	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 280	respondeu a corticoterapia VO-	2.2	CT	CC	1.1	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 149	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	TT	CC	2.2	CC	GC	AC	AG	GA	
PTI 78	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CC	1.1	TT	GC	AC	AA	GA	
PTI 63	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 24	respondeu a corticoterapia VO-	1.2	CC	TT	1.1	CT	GC	CC	AG	GA	
PTI 33	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	CT	1.2	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 57	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	TT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 56	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	CT	2.2	TT	CC	AC	AA	GA	
PTI 172	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	GG	GG	
PTI 156	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	CT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG	
PTI 121	respondeu a corticoterapia VO-	2.3	CC	CC	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 275	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	TT	1.1	CT	CC	AC	AA		
PTI 256	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 104	respondeu a corticoterapia VO-	2.2	CT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 118	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GA	
PTI 161	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AA	AA	AA	
PTI 162	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	TT	CC	1.2	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 166	respondeu a corticoterapia VO-	4.4	CC	TT	1.3	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 155	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	CT	1.2	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 144	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG	
PTI 34	respondeu a corticoterapia após esplenecto		CT	CT	1.1	CT	GG	CT	AG	AA	

CORTICOTERAPIA		POLIMORFISMO									
RESPOSTA POSITIVA		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 143	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	AG	GG	
PTI 177	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	TT	1.1	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 250	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 273	respondeu a corticoterapia VO-	3.3	CC	CT	1.2	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 299	respondeu a corticoterapia VO	1.1	CC	CC	1.1	CT	GG	AA	AA	AA	
PTI 296	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AA	GA	
PTI 323	respondeu a corticoterapia VO-										
PTI 10	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AA	GA	
PTI 19	respondeu a corticoterapia VO-	1.2	CC	TT	1.1	TT	CC	CC	AG	GA	
PTI 72	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 96	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	AC	AG	GG	
PTI 46	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 47	respondeu a corticoterapia VO-	3.3	CT	CT	1.1	TT	GC	CC	GG	GG	
PTI 44	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	TT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 22	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	TT	1.1	CT	CC	CC	AG	GG	
PTI 150	respondeu a corticoterapia VO-	2.2	TT	CC	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 153	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GG	
PTI 117	respondeu a corticoterapia VO-	3.3	CC	CC	1.2	TT	GG	CC	GG	GG	
PTI 282	respondeu a corticoterapia VO-	3.3	CC	CC	1.1	CT	CC	CC	AA	AA	
PTI 261	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AA	AA	AA	
PTI 263	respondeu a corticoterapia VO-	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 262	respondeu a corticoterapia VO-	3.3	CT	CT	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 331	respondeu a corticoterapia VO-	3.3	CC	CC	1.2	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 255	respondeu a corticoterapia VO-	3.3	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 30	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	CT	1.1	CT	CC	CC	AG	GG	
PTI 178	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	GG	GG	
PTI 168	respondeu a corticoterapia VO-	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 307	respondeu a corticoterapia após esplenecto	1.2	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	GG	GG	
PTI 103	respondeu a corticoterapia após esplenecto	1.1	CC	TT	1.2	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 81	respondeu a corticoterapia após esplenecto	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 12	respondeu a corticoterapia após esplenecto		CT	TT	1.1	TT	GC	CC	AA	GG	

CORTICOTERAPIA		POLIMORFISMO										
SEM RESPOSTA OU PARCIAL		IL1RN IL1B+3953CT IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AGIL10-819GA					
PTI 90	resposta parcial	1,1	TT	1,1	TT	GC	AC	AG	GA			
PTI 176	resposta parcial	1,1	CT	1,1	CT	GC	AC	AG	GA			
PTI 298	resposta parcial	1,1	CC	1,2	CT	GG	AC	AA	GA			
PTI 193	resposta parcial	2,2	CT	1,2	CT	GG	CC	AG	GG			
PTI 219	resposta parcial	1,1	CC	1,2	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 17	resposta parcial		CT	1,1	TT	GC	CC	AG				
PTI 66	resposta parcial	1,1	CT	1,1	CT	GC	CC	AG				
PTI 21	resposta parcial		CT	1,1	CT	GC	CC	AG				
PTI 131	resposta parcial	2,3	CT	1,1	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 311	resposta parcial	1,1	CC	1,1	TT	GG	CC	AA	GG			
PTI 213	resposta parcial	1,1	CT	1,1	TT	GG	AC	AA	GA			
PTI 304	resposta parcial	1,1	CT	1,1	CT	CC	AC	AA	GA			
PTI 229	resposta parcial	1,1	CC	1,1	TT	GG	CC	AG	GG			
PTI 83	resposta parcial	1,1	CT	1,1	TT	GC	AC	AG	GA			
PTI 257	SEM RESPOSTA	2,3	CC	1,1	TT	CC	CC	AG	GG			
PTI 272	SEM RESPOSTA	1,1	TT	1,1	TT	GG	CC	AG	GG			
PTI 2	SEM RESPOSTA	1,1	CT	1,1	CT	GC	CC	AG	GG			
PTI 135	SEM RESPOSTA	1,1	CC	1,1	CT	GG	CC	AG	GG			
PTI 278	SEM RESPOSTA	2,2	CC	2,2	GC	GC	CC	GG	GG			
PTI 99	SEM RESPOSTA	1,1	TT	1,1	TT	GC	AC	AA	GA			
PTI 15	SEM RESPOSTA	1,1	CT		TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 25	SEM RESPOSTA		CT	1,1	CT	GG	CC	AG				
PTI 29	SEM RESPOSTA	1,1	CC	1,1	CT	GC	AC	AG	GA			
PTI 127	SEM RESPOSTA	1,1	TT	1,1	TT	GC	CC	AG				
PTI 120	SEM RESPOSTA	1,1	CT	1,2	TT	GC	AC	AG	GA			
PTI 326	SEM RESPOSTA	2,2	CC	1,1	TT	GG	AC	AA	GA			
PTI 308	SEM RESPOSTA	1,1	CC	1,2	TT	GG	CC	GG	GG			
PTI 4	SEM RESPOSTA		CT	1,2	CT	GC	CC	AG				
PTI 16	SEM RESPOSTA	1,1	CT	1,1	CT	GC	CC	AG	GG			
PTI 32	SEM RESPOSTA	1,1	CC	1,2	CT	GC	CC	GG	GG			
PTI 41	SEM RESPOSTA	1,1	CT	2,2	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 71	SEM RESPOSTA	1,1	CC	1,2	TT	GC	AC	AG	GA			

CORTICOTERAPIA		POLIMORFISMO									
SEM RESPOSTA OU PARCIAL		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AGIL	10-819GA	
PTI 159	SEM RESPOSTA	1.1	CT	TT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 158	SEM RESPOSTA	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	AA	GA	
PTI 274	SEM RESPOSTA	1.1	CC	TT	1.1	TT	GG		AG	GA	
PTI 314	SEM RESPOSTA	4.4	CC	TT	1.2	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 222	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	AC	AA	AA	
PTI 6	SEM RESPOSTA	1.1	CT	CC	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 164	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 192	SEM RESPOSTA	3.3	CT	CC	1.2	CT	GG	AA	AA	AA	
PTI 223	SEM RESPOSTA	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 265	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CC	2.2	CT	GG	CC	AA	GG	
PTI 290	SEM RESPOSTA	1.3	CT	CC	1.2	TT	GC	AC	AA	GA	
PTI 62	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.2	TT	CC	AA	AA	AA	
PTI 54	SEM RESPOSTA	3.3	CC	TT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 165	SEM RESPOSTA	1.1	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AA	GA	

ANEXO 5: Resposta clínica à ESPLENECTOMIA e padrão polimórfico associado a ela.

ESPLENECTOMIA		POLIMORFISMO									
RESPOSTA POSITIVA	IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA		
PTI 53	1.1	CC	TT	2.2	CT	GC	CC	AG			
PTI 246	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AA	GG		
PTI 129	2.2	CT	TT	2.2	CT	GC	AC	AG	GA		
PTI 73	2.2	CC	CT	1.2	TT	GC	AC	AA	GA		
PTI 128	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	CC	AG	GG		
PTI 257	2.3	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG		
PTI 272	1.1		TT	1.1	TT	GG					
PTI 2	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	CC	AG	GG		
PTI 135	1.1	CC	CC	1.1	CT	GG	CC	AG	GG		
PTI 204	3.3	CT	CC	1.1	CT	GC	CC	GG	GG		
PTI 100	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA		
PTI 99	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	AC	AA	GA		
PTI 249	2.2	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AG	GA		
PTI 196	3.3	TT	CC	1.1	CT	GC	CC	AG	GG		
PTI 116	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	AC	AG	GA		
PTI 79	1.4	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG		
PTI 75	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA		
PTI 70	1.1	CC	CC	1.1	TT	GC	CC	GG	GG		
PTI 58	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AA	GG		
PTI 39	1.1	CC	CT	2.2	CT	GG	CC	AA	GG		
PTI 5	1.1					GG	AA	AA	AA		
PTI 18		CT	TT	1.2	CT	GC	AC	AA			
PTI 224	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	CC	GG			
PTI 120	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	AC	AG	GA		
PTI 326	2.2	CC	TT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA		
PTI 308	1.1	CC	TT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG		
PTI 4			CT	1.2	CT			AG			
PTI 16	1.1	CT	CT	1.1	CT	GC	CC	AG	GG		
PTI 32	1.1	CC	CT	1.2	CT	GC	CC	GG	GG		
PTI 41	1.1	CT	CT	2.2	TT	GG	AC	AG	GA		

ESPLENECTOMIA		POLIMORFISMO									
RESPOSTA POSITIVA	IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA		
PTI 71	1.1	CC	CC	1.2	TT	GC	AC	AG	GA		
PTI 158	1.1	CT	TT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA		
PTI 176	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AG	GA		
PTI 298	1.1	CC	CC	1.2	CT	GG	AC	AA	GA		
PTI 23	1.1	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AG	GA		
PTI 104	2.2	CT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA		
PTI 118	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GA		
PTI 180	1.1	CC	CT	2.2	CT	GG	AA	AA	AA		
PTI 314	1.1	CC	TT	1.1	TT	GG	AA	AG	GA		
PTI 164	1.1	CT	CC	1.2	CT	GG	CC	AG	GG		
PTI 27		CT	CT	1.1				AG			
PTI 107	2.2	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	AA	GG		
PTI 175	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	CC	GG	GG		
PTI 214	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA		
PTI 219	1.1	CC	CC	1.2	TT	GG	AC	AG	GA		

ESPLENECTOMIA		POLIMORFISMO									
SEM RESPOSTA OU PARCIAL		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 307		1.2	CC	TT	1.2	CT	GG	AC	AA	GG	
PTI 159	parcial	1.1	CT	TT	2.2	CT	GG	CC	GG	GG	
PTI 193	parcial	2.2	CC	CT	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 103	parcial	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 278	SEM RESPOSTA	2.2	CC	CT	2.2	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 274	SEM RESPOSTA	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	AA	GG	
PTI 42	SEM RESPOSTA	1.3	CT	CT	1.1	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 34	SEM RESPOSTA	1.1	CT	CT	1.1	CT	GC	CC	AG	AA	
PTI 222	SEM RESPOSTA	4.4	CC	TT	1.2	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 16	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	AC	AA	AA	
PTI 229	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 81	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 12	SEM RESPOSTA	1.1	CT	TT	1.1	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 91	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	2.2	CT	GC	CC	AG	GG	

ANEXO 7: Resposta clínica à DAPSONA e padrão polimórfico associado a ela.

DAPSONA		POLIMORFISMO									
RESPOSTA POSITIVA	IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA		
Boa resposta	2.2	CC	CT	1.2	TT	GC	AC	AA	GA		
Boa resposta	1.2	CC	TT	1.1	CT	GC		AG	GA		
Boa resposta	1.1	CC	CT	1.1	CT	GG	AC	AG	GA		
boa resposta	2.2	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AG	GA		
boa resposta	1.4	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG		
boa resposta	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA		
boa resposta	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AA	GG		
boa resposta	1.1	CC	CT	2.2	CT	GG	CC	AA	GG		
boa resposta	2.2	CT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA		
boa resposta	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GA		
boa resposta	1.1	CT	CT	1.2	TT	GG	AC	AA	GA		
boa resposta	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA		
boa resposta	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC					
boa resposta	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AG	GA		
boa resposta	1.1	CT	CC	1.1	TT	GG	AC	AA	GA		
boa resposta	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC					
boa resposta	1.1	CT	CC	1.1	CT	GG	AC	AA	GA		
boa resposta	3.3	CT	CT	1.2	CT	GG	CC	AG	GG		
boa resposta	1.1	CT	CT	1.1	CT	GC					
boa resposta	1.1	CC	CT	1.2	CT	GC	CC	GG	GG		
boa resposta	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA		
boa resposta	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA		
boa resposta	1.1	CT	CT	1.1	CT	GC					

DAPSONA		POLIMORFISMO									
SEM RESPOSTA OU PARCIAL		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 272	SEM RESPOSTA	1.1		TT	1.1	TT	GG				
PTI 278	SEM RESPOSTA	2.2	CC		2.2		GC	CC	GG	GG	
PTI 15	SEM RESPOSTA	1.1				TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 25	SEM RESPOSTA		CT	CT	1.1	CT			AG		
PTI 90	SEM RESPOSTA	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 16	SEM RESPOSTA	1.1	CT	CT	1.1	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 32	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.2	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 274	SEM RESPOSTA	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	AA		
PTI 222	SEM RESPOSTA	4.4	CC	TT	1.2	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 193	SEM RESPOSTA	2.2	CC	CT	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 6	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	AC	AA	AA	
PTI 164	SEM RESPOSTA	1.1	CT	CC	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 214	SEM RESPOSTA	3.3	CC	TT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 229	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 318	SEM RESPOSTA	1.1	CC	TT		CT	GC	AA	AA	AA	
PTI 326	resposta parcial	2.2	CC	TT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 34	resposta parcial		CT	CT	1.1	CT			AG	AA	
PTI 265	resposta parcial	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 83	resposta parcial	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 237	resposta parcial	2.2	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 157	resposta parcial	1.1	CC	CC	1.1	TT	CC	AC	AG	GA	

**ANEXO 8: Resposta clínica à outros tratamentos como Azatioprina, Ciclofosfamida, Sulfasalazina e Rituximab e padrão polimórfico associado a ela.**

OUTROS TRATAMENTOS									
POLIMORFISMO									
RESPOSTA POSITIVA	IL 1RN	IL 1B+3953CT	IL 1B-511CT	IL 4 VNTR	IL 4-590CT	IL 6-176GC	IL 10-592AC	IL 10-1082AG	IL 10-819GA
PTI 58	boa resposta	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	AA	GG
PTI 39	boa resposta	1.1	CC	CT	2.2	CT	GG	AA	GG
PTI 104	boa resposta	2.2	CT	CC	1.1	TT	GC	AG	GA
PTI 59	boa resposta	1.1	CT	CT	1.2	TT	GG	AA	
PTI 117	boa resposta	3.3	CC	CC	1.2	TT	GG	CC	GG
PTI 8	boa resposta			CT	1.1	CT	GG	AG	

OUTROS TRATAMENTOS									
POLIMORFISMO									
SEM RESPOSTA OU PARCIAL	IL 1RN	IL 1B+3953CT	IL 1B-511CT	IL 4 VNTR	IL 4-590CT	IL 6-176GC	IL 10-592AC	IL 10-1082AG	IL 10-819GA
PTI 278	SEM RESPOSTA	2.2	CC				GC	CC	GG
PTI 15	SEM RESPOSTA	1.1				TT	GG	AC	GA
PTI 25	SEM RESPOSTA		CT	CT	1.1	CT		AG	
PTI 90	SEM RESPOSTA	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AC	GA
PTI 16	SEM RESPOSTA	1.1	CT	CT	1.1	CT	GC	CC	GG
PTI 32	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.2	CT	GC	CC	GG
PTI 274	SEM RESPOSTA	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	AA
PTI 222	SEM RESPOSTA	4.4	CC	TT	1.2	CT	GC	AC	AG
PTI 34	SEM RESPOSTA	1.1	CT	CT	1.1	CT	AG	AG	AA
PTI 6	SEM RESPOSTA	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	AC	AA
PTI 165	resposta parcial	3.3	CC	TT	1.1	TT	GG	CC	GG

**ANEXO 6: Pacientes que não realizaram tratamento e pacientes que realizaram .**

SEM TRATAMENTO		POLIMORFISMO									
		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 291	somente acompanhou n° plts	1.1	CC	TT	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 126	somente acompanhou n° plts	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	AC	AG	AA	
PTI 85	somente acompanhou n° plts	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 87	somente acompanhou n° plts	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AG	GG	
PTI 254	somente acompanhou n° plts	2.2	CT	CT	2.2	CT	GG	CC	GG	GG	
PTI 189	somente acompanhou n° plts	3.3	CC	CT	1.2	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 244	somente acompanhou n° plts	1.1	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 228	somente acompanhou n° plts	1.1	CT	TT	1.1	TT		AA	AA	AA	
PTI 327	somente acompanhou n° plts	1.1		TT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG	
PTI 170	somente acompanhou n° plts	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	AA	
PTI 253	somente acompanhou n° plts	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 238	somente acompanhou n° plts	2.2	CT	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 243	somente acompanhou n° plts	1.2	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 190	somente acompanhou n° plts	3.3	CT	CC	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 167	somente acompanhou n° plts	1.1	CT	CC	1.1	CT	GG	AC	AA	GA	

COM TRATAMENTO		POLIMORFISMO									
		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 307	realizou tratamento	1.2	CC	TT	1.2	CT	GG	AC	AA	GG	
PTI 53	realizou tratamento	1.1	CC	TT	2.2	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 246	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AA	GG	
PTI 73	realizou tratamento	2.2	CC	CT	1.2	TT	GC	AC	AA	GA	
PTI 257	realizou tratamento	2.3	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 272	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 2	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 136	realizou tratamento	1.1	CC	CC	1.1	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 204	realizou tratamento	3.3	CT	CC	1.1	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 100	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 103	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 278	realizou tratamento	2.2	CC	CC	2.2	TT	GC	CC	GG	GG	
PTI 99	realizou tratamento	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	AC	AA	GA	
PTI 15	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 25	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 60	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AA	GA	
PTI 280	realizou tratamento	2.2	CT	CC	1.1	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 149	realizou tratamento	1.1	TT	CC	2.2	CC	GC	AC	AG	GA	
PTI 78	realizou tratamento	1.1	CC	CC	1.1	TT	GC	AC	AA	GA	
PTI 63	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 24	realizou tratamento	1.2	CC	TT	1.1	CT	GC	CC	AG	GA	
PTI 267	realizou tratamento	3.3	CT	CT	1.1	TT	CC	CC	AA	GA	
PTI 29	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 127	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GA	
PTI 33	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.2	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 57	realizou tratamento	1.1	CT	TT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 56	realizou tratamento	1.1	CT	CT	2.2	TT	CC	AC	AA	GA	
PTI 172	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	GG	GG	
PTI 156	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG	
PTI 121	realizou tratamento	2.3	CC	CC	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 275	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	AC	AA	GA	

COM TRATAMENTO		POLIMORFISMO									
		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 256	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 90	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 51	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 48	realizou tratamento	1.1	TT	CT	1.1	CT	GG	CC	GG	GG	
PTI 279	realizou tratamento	1.2	CT	TT	1.2	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 249	realizou tratamento	2.2	CT	CT	1.2	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 196	realizou tratamento	3.3	TT	CC	1.1	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 116	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 79	realizou tratamento	1.4	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 75	realizou tratamento	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 70	realizou tratamento	1.1	CC	CC	1.1	TT	GC	CC	GG	GG	
PTI 58	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AA	GG	
PTI 39	realizou tratamento	1.1	CC	CT	2.2	CT	GG	CC	AA	GG	
PTI 5	realizou tratamento	1.1	CT	TT	1.2	CT	GG	AA	AA	AA	
PTI 18	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.2	CT	GC	AC	AA	AA	
PTI 224	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	CC	GG	GG	
PTI 120	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 326	realizou tratamento	2.2	CC	TT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 308	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG	
PTI 4	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.2	CT	GC	CC	AG	AG	
PTI 16	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.1	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 32	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.2	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 41	realizou tratamento	1.1	CT	CT	2.2	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 71	realizou tratamento	1.1	CC	CC	1.2	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 159	realizou tratamento	1.1	CT	TT	2.2	CT	GG	CC	GG	GG	
PTI 158	realizou tratamento	1.1	CT	TT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 274	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	AA	AA	
PTI 222	realizou tratamento	4.4	CC	TT	1.2	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 81	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 12	realizou tratamento	1.1	CT	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	AG	
PTI 176	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 34	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.1	CT	CT	CT	AG	AA	

COM TRATAMENTO		POLIMORFISMO									
		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 298	realizou tratamento	1.1	CC	CC	1.2	CT	GG	AC	AA	GA	
PTI 193	realizou tratamento	2.2	CC	CT	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 104	realizou tratamento	2.2	CT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 118	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GA	
PTI 314	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GG		AG	GA	
PTI 6	realizou tratamento										
PTI 164	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	AC	AA	AA	
PTI 59	realizou tratamento	1.1	CT	CC	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 27	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.2	TT	GG	AC	AA		
PTI 107	realizou tratamento		CT	CT	1.1	TT			AG		
PTI 175	realizou tratamento	2.2	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	AA	GG	
PTI 214	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 229	realizou tratamento	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 91	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 219	realizou tratamento	1.1	CC	CT	2.2	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 161	realizou tratamento	1.1	CC	CC	1.2	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 261	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AA	AA	AA	
PTI 162	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AA	AA	AA	
PTI 166	realizou tratamento	1.1	TT	CC	1.2	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 155	realizou tratamento	4.4	CC	TT	1.3	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 144	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.2	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 143	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG	
PTI 177	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	AG	GG	
PTI 250	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 273	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 299	realizou tratamento	3.3	CC	CT	1.2	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 296	realizou tratamento	1.1	CC	CC	1.1	CT	GG	AA	AA	AA	
PTI 323	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AA	GA	
PTI 10	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AA	GA	
PTI 19	realizou tratamento	1.2	CC	TT	1.1	TT	CC	CC	AG	GA	
PTI 72	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 96	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	AC	AG	GG	

COM TRATAMENTO		POLIMORFISMO									
		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PtI 46	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PtI 47	realizou tratamento	3.3	CT	CT	1.1	TT	GC	CC	GG	GG	
PtI 44	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GG	CC	AG	AG	
PtI 22	realizou tratamento	1.1	CT	TT	1.1	CT			AG		
PtI 192	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA	
PtI 223	realizou tratamento	3.3	CT	CC	1.2	CT	GG	AA	AA	AA	
PtI 265	realizou tratamento	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PtI 290	realizou tratamento	1.1	CC	CC	2.2	CT	GG	CC	AA	GG	
PtI 62	realizou tratamento	1.3	CT	CC	1.2	TT	GC	AC	AA	GA	
PtI 54	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.2	TT	CC	AA	AA	AA	
PtI 52	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PtI 50	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	AG	GG	
PtI 1	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AA	GA	
PtI 312	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC		GA	
PtI 241	realizou tratamento	3.3	CT	CT	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PtI 211	realizou tratamento	1.1	TT	CT	1.1	CT	GG	CC	AG	GG	
PtI 20	realizou tratamento	1.1	TT	CT	1.2	CT	CC	CC	AG	GG	
PtI 209	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	CC	AG	GG	
PtI 17	realizou tratamento		CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AG	GG	
PtI 66	realizou tratamento	1.1	CT	CC	1.1	CT	GC	CC	AG		
PtI 21	realizou tratamento		CT	CT	1.1	CT	GC	CC	AG		
PtI 131	realizou tratamento	2.3	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PtI 311	realizou tratamento	1.1	CT	CC	1.1	TT	GG	CC	AA	GG	
PtI 213	realizou tratamento	1.1	CT	CC	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PtI 318	realizou tratamento	1.1	CC	TT		CT	GC	AA	AA	AA	
PtI 150	realizou tratamento	2.2	TT	CC	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PtI 153	realizou tratamento	1.1	CT	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GG	
PtI 117	realizou tratamento	3.3	CC	CC	1.2	TT	GG	CC	GG		
PtI 282	realizou tratamento	3.3		CC	1.1	CT	CC	CC	AA		
PtI 263	realizou tratamento	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PtI 262	realizou tratamento	3.3	CT	CT	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PtI 331	realizou tratamento	3.3	CC	CC	1.2	TT	GG	AC	AA	GA	

COM TRATAMENTO		POLIMORFISMO									
		IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 255	realizou tratamento	3.3	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 30	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.1	CT			AG	AG	
PTI 178	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.2	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 168	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 304	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	CT	CC	AC	AA	GA	
PTI 83	realizou tratamento	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 165	realizou tratamento	3.3	CC	TT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 333	realizou tratamento	1.1	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AA	GA	
PTI 45	realizou tratamento		CT	CT	1.1	CT			AG	AG	
PTI 242	realizou tratamento	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 237	realizou tratamento	2.2	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 11	realizou tratamento	1.1	CT	TT	1.2	CT	GC	AC	AG	GA	
PTI 8	realizou tratamento		CT	CT	1.1	CT	GG		AG	AG	
PTI 64	realizou tratamento		CT	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 157	realizou tratamento	1.1	CC	CC	1.1	TT	CC	AC	AG	GA	

**ANEXO 7: Pacientes que foram diagnosticados com plaquetas abaixo ou igual a 20.000 mm3 e os que foram diagnosticados com plaquetas acima de 20.000.**

PLAQUETAS											
	ABAIXO DE 20.000/mm	IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 53	11000	1.1	CC	TT	2.2	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 246	10000	1.1	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AA	GA	
PTI 73	11000	2.2	CC	CT	1.2	TT	GC	AC	AA	GA	
PTI 257	7000	2.3	CC	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 135	1000	1.1	CC	CC	1.1	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 204	1000	3.3	CT	CC	1.1	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 103	5000	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA	
PTI 278	3000	2.2	CC	CC	2.2	TT	GC	CC	GG	GG	
PTI 99	11000	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	AC	AA	GA	
PTI 60	4000	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 149	4000	1.1	TT	CC	2.2	CC	GC	AC	AG	GA	
PTI 78	17000	1.1	CC	CC	1.1	TT	GC	AC	AA	GA	
PTI 29	7000	1.1	CC	CT	1.1	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 127	1000	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GA	
PTI 57	5000	1.1	CT	TT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 56	2000	1.1	CT	CT	2.2	TT	CC	AC	AA	GA	
PTI 156	9000	1.1	CT	CT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG	
PTI 256	2000	1.1	CT	CT	1.1	TT	CC	CC	AG	GG	
PTI 249	6000	2.2	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AG	GA	
PTI 116	6000	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 75	3000	1.1	TT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA	
PTI 58	16000	1.1	CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AA	GG	
PTI 39	7000	1.1	CC	CT	2.2	CT	GG	CC	AA	GG	
PTI 18	11000		CT	TT	1.2	CT	GC	AC	AA	GG	
PTI 4	11000		CT	CT	1.2	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 16	2000	1.1	CT	CT	1.1	CT	GC	CC	AG	GG	
PTI 32	8000	1.1	CC	CT	1.2	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 41	10000	1.1	CT	CT	2.2	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 274	5000	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	CC	AA	GA	

PLAQUETAS											
ABAIXO DE 20.000/mm											
	IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4	VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 176	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AG	GA		
PTI 104	2.2	CT	CC	1.1	TT	GC	AC	AG	GA		
PTI 314	1.1	CC	TT	1.1	TT	GG		AG	GA		
PTI 164	1.1	CT	CC	1.2	CT	GG	CC	AG	GG		
PTI 59	1.1	CT	CT	1.2	TT	GG	AC	AA			
PTI 175	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	CC	GG	GG		
PTI 214	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA		
PTI 229	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG		
PTI 91	1.1	CC	CT	2.2	CT	GC	CC	AG	GG		
PTI 219	1.1	CC	CC	1.2	TT	GG	AC	AG	GA		
PTI 161	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AA	AA	AA		
PTI 162	1.1	TT	CC	1.2	TT	GG	CC	AG	GG		
PTI 155	1.1	CT	CT	1.2	TT	GC	AC	AG	GA		
PTI 144	1.1	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	GG	GG		
PTI 177	1.1	CC	TT	1.1	CT	GC	AC	AG	GA		
PTI 250	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG		
PTI 273	3.3	CC	CT	1.2	TT	GG	AA	AA	AA		
PTI 323											
PTI 10	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC	AA	GA		
PTI 72	1.1	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	AA	GG		
PTI 96	1.1	CC	TT	1.1	CT	GG	AC	AG	GG		
PTI 46	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA		
PTI 47	3.3	CT	CT	1.1	TT	GC	CC	GG	GG		
PTI 44	1.1	CC	TT	1.1	TT	GG	CC	AG			
PTI 192	1.1	CC	CT	1.1	TT	GG	AA	AA	AA		
PTI 223	3.3	CT	CC	1.2	CT	GG	AA	AA	AA		
PTI 290	1.1	CC	CC	2.2	CT	GG	CC	AA	GG		
PTI 54	1.1	CC	CT	1.2	TT	CC	AA	AA	AA		
PTI 50	1.1	CC	CT	1.2	TT	GC	CC	AG	GG		
PTI 1	1.1	CT	CT	1.2	CT	GG	AC	AA	GA		

PLAQUETAS										
ABAIXO DE 20.000/mm	IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4 VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA	
PTI 312	1.1	CC	CT	1.1	CT	GC	AC		GA	
PTI 211	1.1	TT	CT	1.1	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 17		CC	CT	1.1	TT	GC	CC	AG		
PTI 66	1.1	CT	CC	1.1	CT	GC	CC	AG		
PTI 318	1.1	CC	TT		CT	GC	AA	AA	AA	
PTI 153	1.1	CT	TT	1.1	TT	GC	CC	AG	GG	
PTI 282	3.3	CT	CC	1.1	CT	CC	CC	AA		
PTI 261	1.1	CC	TT	1.1	TT	GC	AA	AA	AA	
PTI 263	3.3	CC	CT	1.1	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 262	3.3	CT	CT	1.2	CT	GG	CC	AG	GG	
PTI 331	3.3	CC	CC	1.2	TT	GG	AC	AA	GA	
PTI 30	1.1	CT	CT	1.1	CT	CT		AG		
PTI 178	1.1	CC	CT	1.2	CT	GC	CC	GG	GG	
PTI 168	1.1	CT	CT	1.1	TT	GG	AC	AG	GA	
PTI 165	3.3	CC	TT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	
PTI 45		CT	CT	1.1	CT			AG		
PTI 237	2.2	CC	CT	1.2	TT	GG	CC	AA	GG	
PTI 8		CT	CT	1.1	CT	GG	GG	AG		
PTI 64		CT	CT	1.1	TT	GG	CC	AG	GG	



PLAQUETAS												
ACIMA DE 20.000/mm												
IL1RN	IL1B+3953CT	IL1B-511CT	IL4	VNTR	IL4-590CT	IL6-176GC	IL10-592AC	IL10-1082AG	IL10-819GA			
PTI 27	52000	CT	1.1	CT	TT	GC	CC	AG	GG			
PTI 107	50000	CC	2.2	CT	CT	GG	CC	AA	GA			
PTI 166	27000	CC	4.4	CT	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 143	36000	CC	1.1	CT	TT	GC	CC	AG	GG			
PTI 296	41000	CC	1.1	CT	CT	GC	AC	AA	GA			
PTI 19	51000	CC	1.2	TT	TT	CC	CC	AG	GA			
PTI 22	20000	CT	1.1	TT	CT			AG				
PTI 265	41000	CC	3.3	CT	TT	GG	CC	AA	GG			
PTI 62	68000	CT	1.3	CC	TT	GC	AC	AA	GA			
PTI 52	82000	CC	1.1	CT	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 241	25000	CT	3.3	CT	TT	GG	CC	AA	GG			
PTI 187	54000	CT	2.2	CT	CT	GG	AC	AG	GA			
PTI 131	89000	CC	2.3	CT	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 311	24000	CT	1.1	CC	TT	GG	CC	AA	GG			
PTI 213	32000	CT	1.1	CC	TT	GG	AC	AA	GA			
PTI 126	76000	CC	1.1	CT	TT	CC	AC	AG	AA			
PTI 85	72000	CC	1.1	CC	TT	GC	AC	AG	GA			
PTI 87	106000	CC	1.1	CT	TT	GC	CC	AG	GG			
PTI 254	78000	CT	2.2	CT	TT	GG	CC	AG	GG			
PTI 189	51000	CC	3.3	CT	CT	GG	CC	GG	GG			
PTI 244	77000	CC	1.1	CT	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 228	70000	CT	1.1	TT	TT	GG	CC	AG	GG			
PTI 150	87000	TT	2.2	CC	TT	CC	AA	AA	AA			
PTI 117	27000	CC	3.3	CC	TT	GG	CC	AG	GG			
PTI 255	22000	CT	3.3	CT	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 304	20000	CT	1.1	CT	CT	CC	AC	AA	GA			
PTI 83	35000	CC	1.1	TT	TT	GC	AC	AG	GA			
PTI 333	29000	CT	1.1	CT	CT	GG	AC	AA	GA			
PTI 242	20000	CC	1.1	CT	TT	CC	CC	AG	GG			
PTI 11	39000	CT	1.1	TT	CT	GC	AC	AG	GA			
PTI 157	55000	CC	1.1	CC	TT	CC	AC	AG	GA			
PTI 170	69000	CC	1.1	CT	TT	GG	CC	AA	AA			
PTI 327	54000	TT	1.1	TT	TT	GG	CC	GG	GG			
PTI 253	29000	CC	1.1	CT	TT	GG	AA	AA	AA			
PTI 238	66000	CT	2.2	CT	TT	CC	CC	AG	GG			
PTI 243	80000	CC	1.2	CT	TT	CC	CC	AG	GG			
PTI 190	81000	CT	3.3	CT	TT	GG	AC	AG	GA			
PTI 167	71000	CT	1.1	CC	CT	GG	AC	AA	GA			