

ANA CRISTINA WESTPHAL CHERARIA BIRAL

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS ALELOS
HLA DE CLASSE I E NOS MICROSSATÉLITES DO FATOR
DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES BRASILEIROS
COM PSORÍASE VULGAR**

CAMPINAS

2005

ANA CRISTINA WESTPHAL CHERARIA BIRAL

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS ALELOS
HLA DE CLASSE I E NOS MICROSSATÉLITES DO FATOR
DE NECROSE TUMORAL EM PACIENTES BRASILEIROS
COM PSORÍASE VULGAR**

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

ORIENTADORA: *Prof.^a Dr.^a Maria Helena Stangler Kraemer*

CAMPINAS

2005

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TilhiCamp
	B53c
V	EX
TOMBO, BC/	64194
PROC.	06.P.00086.05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	13/06/05
Nº CPD	

Bibrid: 352175

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B538C

Biral, Ana Cristina Westphal Cheraria

Caracterização do polimorfismo dos alelos HLA de classe I e nos microssatélites do fator de necrose tumoral em pacientes brasileiros com psoríase vulgar/ Ana Cristina Westphal Cheraria Biral. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Maria Helena Stangler Kraemer

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

1. Psoríase. 2. Complexo principal de histocompatibilidade. 3. Susceptibilidade à doença. I. Kraemer, Maria Helena Stangler. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Helena Stangler Kraemer

Membros:

1. Prof. Dr. Paulo Louzada Junior

2. Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

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

Data: 14/02/05

Esse trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP – UNICAMP) e do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo – USP.

—

DEDICATÓRIA

*Aos meu pais, Santo e Wilma, exemplos de dedicação e honestidade,
que com carinho e amor iluminaram meu caminho.*

*Ao meu marido Antonio Carlos e aos meus filhos Matheus e Paula,
pelo amor, incentivo e apoio constantes, pela paciência e
compreensão em todo o período desta tese. Agradeço a Deus a benção
e o privilégio de tê-los em minha vida.*

AGRADEÇO ESPECIALMENTE,

à Profa. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer, pelo privilégio e honra de tê-la como orientadora. O seu apoio, incentivo e orientação me fizeram acreditar e foram determinantes na construção desta tese.

O meu agradecimento é muito pouco para expressar a minha gratidão, que será eterna.

À todos os amigos preciosos, que fazem valer este momento. São muitos, antigos, atuais e de sempre. Tenho a alegria de compartilhar com eles esta caminhada. Meus agradecimentos a todos.

À minha “família” do Laboratório de Imunogenética, Margareth, Arthur, Vera, Noelia e Profa. Maria Helena pela generosidade, apoio diário e a oportunidade privilegiada de conviver com pessoas especiais, que deixam marcas profundas de companheirismo, profissionalismo e acima de tudo, amizade.

À Profa. Dra. Ana Maria Uthida-Tanaka, pela sua atenção e colaboração que permitiu o acesso junto aos pacientes do Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas – UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela cooperação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Magna, do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela sua colaboração e apoio no estudo estatístico desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões e Prof. Celso Teixeira Mendes-Junior do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela colaboração que permitiu complementar o estudo estatístico neste trabalho.

Aos Profs. Drs. Paulo Louzada Júnior e Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, por terem aceito o convite para participar da banca Examinadora, o que muito nos honra e valoriza o nosso trabalho.

À Dra. Renata Ferreira Magalhães, pela sua colaboração na obtenção dos pacientes e principalmente pela sua atenção e amizade.

À Isabela, Renata e Sandra do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Riberão Preto – USP, pela amizade, atenção e apoio.

Ao Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela infra-estrutura para a realização desse trabalho.

Ao Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que possibilitou o desenvolvimento dessa tese.

Às secretárias do departamento de Patologia Clínica, Silvia, Marlucia e Regina, pelo carinho e colaboração.

Especialmente agradeço:

Aos meus irmãos, Heloisa Helena, Maria Else e Eduardo, fontes de afeto e indispensável apoio.

Aos meus avós e tios, mesmo distantes, presentes nessa caminhada.

Aos pacientes, nossos principais colaboradores...

*“Há quem diga que todas as noites são de sonhos
Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão
Mas no fundo isso não tem muita importância
O que interessa mesmo não são as noites, os dias em si, são os
sonhos
Sonhos que o homem sonha sempre
Em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou
acordado.”*

(Shakespeare)

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xxxi</i>
ABSTRACT	<i>xxxv</i>
1- INTRODUÇÃO	39
1.1- Psoríase	41
1.1.1- Manifestações clínicas.....	41
1.1.2.- Etiopatogenia.....	45
1.1.3- Hipótese na patogênese.....	46
1.2- Genética da psoríase	50
1.2.1- O complexo principal de histocompatibilidade.....	51
1.2.1.1- Organização genética do CPH.....	54
1.2.1.2- Polimorfismo do CPH.....	56
1.2.1.3- Herança dos genes do CPH.....	56
1.2.1.4- Identificação dos genes na doença.....	56
1.2.2- Associação do HLA na Psoríase.....	58
1.2.3- Fator de necrose tumoral-TNF.....	58
1.2.3.1- Microssatélites do TNF.....	59
1.2.3.2- Associação dos microssatélites TNF e doenças.....	61
1.2.3.3- Polimorfismo na região promotora com doenças.....	62

2- OBJETIVOS.....	63
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.1- População de estudo.....	69
3.2- Tipagem dos genes HLA de classe I.....	71
3.2.1- Extração e purificação do DNA.....	72
3.2.2- Amplificação do gene HLA-A, -B, -C utilizando-se a reação em cadeia da polimerase com “primers” sequência-específica PCR/SSP.....	73
3.2.3- Análise do DNA amplificado.....	74
3.2.4- Fotodocumentação e interpretação de resultados.....	74
3.2.5- Associação e detecção dos alelos HLA.....	74
3.3- Tipagem dos Microssatélites TNF.....	75
3.3.1- Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	76
3.3.2- Análise do produto amplificado.....	78
3.4- Análise Estatística.....	80
4- RESULTADOS.....	83
4.1- Tipagem dos alelos HLA-A, -B, -C.....	85
4.2- Avaliação das frequências de alelos HLA de classe I entre os pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	91
4.3- Tipagem dos microssatélites TNF.....	93
4.4- Avaliação das frequências dos STRs TNF entre os pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	95
4.5- Análise dos haplótipos HLA-B, -C e STR TNF com a utilização de métodos computacionais.....	100

5- DISCUSSÃO.....	105
6- CONCLUSÕES.....	113
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
8- ANEXOS.....	135

	PÁG.
Tabela 1- Características dos STRs do gene TNF.....	61
Tabela 2- Características dos 92 pacientes com psoríase vulgar estudados.....	70
Tabela 3- Relação dos marcadores polimórficos de DNA utilizados.....	75
Tabela 4- Condições específicas para eletroforese de cada loco polimórfico estudado.....	80
Tabela 5- Distribuição dos alelos HLA-A, -B, -C no grupo de pacientes com psoríase vulgar.....	86
Tabela 6- Distribuição dos alelos HLA-A, -B, -C no grupo-controle de indivíduos sadios.....	88
Tabela 7- Distribuição das frequências (%) dos alelos HLA-A, -B, -C nos pacientes com psoríase vulgar e no grupo-controle de indivíduos sadios.....	90
Tabela 8- Frequências (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I nos pacientes com psoríase vulgar e grupo-controle de indivíduos sadios.....	91
Tabela 9- Frequências (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I nos pacientes com psoríase tipo I e grupo-controle de indivíduos sadios.....	92
Tabela 10- Frequências (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I nos pacientes com psoríase tipo II e no grupo-controle de indivíduos sadios.....	93
Tabela 11- Distribuição das frequências (%) dos alelos STRs TNF nos pacientes com psoríase vulgar n=70 e grupo-controle de indivíduos sadios n=71.....	98

Tabela 12-	Frequências (%) e significância estatística dos alelos STRs TNF nos pacientes com psoríase vulgar e grupo-controle de indivíduos sadios.....	99
Tabela 13-	Frequências (%) e significância estatística dos alelos STRs TNF nos pacientes com psoríase tipo I e grupo-controle de indivíduos sadios.....	99
Tabela 14-	Frequências (%) e significância estatística dos alelos STRs TNF nos pacientes psoríase tipo II e grupo-controle de indivíduos sadios.....	100
Tabela 15-	Frequências absolutas e relativas dos haplótipos HLA-B, -C, obtidas com a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos métodos EM e PHASE.....	137
Tabela 16-	Frequências absolutas e relativas dos haplótipos do STR TNF, obtidas com a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos métodos EM e PHASE.....	139
Tabela 17-	Estimativas de diversidade haplotípica em cada grupo amostral.....	141
Tabela 18-	Valores de probabilidade obtidos através de teste exato de diferenciação haplotípica.....	142
Tabela 19-	Frequências absolutas e relativas dos haplótipos que apresentaram significância estatística entre o grupo total de pacientes com psoríase, psoríase tipo I, psoríase tipo II e grupo-controle de indivíduos sadios.....	103
Tabela 20-	Frequências absolutas e relativas dos haplótipos STR TNFa, b, c, d, e, HLA-B, -C, obtidas com a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos métodos EM e PHASE.....	143

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Avaliação histológica da lesão.....	46
Figura 2- Modelo proposto das estruturas e funções do transportador de peptídeos e do complexo proteossomo.....	52
Figura 3- Representação esquemática do complexo molecular quaternário...	54
Figura 4- Mapa simplificado do CPH no cromossomo 6.....	55
Figura 5- Polimorfismo do loco TNF com os cinco STRs.....	60
Figura 6- Localização dos dois polimorfismos da região promotora no loco TNF do CPH de classe III no cromossomo 6.....	62
Figura 7- Ilustra uma tipagem HLA de classe I de um indivíduo do estudo...	85
Figura 8- Gel de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos alelos do loco TNFa.....	94
Figura 9- Ilustra a tipagem dos alelos do STR/TNF do loco TNFa de indivíduos do estudo.....	94
Figura 10- Frequência dos alelos TNFa em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	95
Figura 11- Frequência dos alelos TNFb em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	96
Figura 12- Frequência dos alelos TNFc em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	96
Figura 13- Frequência dos alelos TNFd em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	97
Figura 14- Frequência dos alelos TNFe em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	97

RESUMO

Introdução- A psoríase é uma doença de pele crônica, inflamatória com genes envolvidos na predisposição à doença, localizados na região altamente polimórfica do complexo principal de histocompatibilidade, no cromossomo 6p21.3. O objetivo desse estudo foi identificar, avaliar a distribuição e determinar as associações genéticas dos genes HLA de classe I e os microssatélites do Fator de Necrose Tumoral (TNF) em pacientes brasileiros com psoríase.

Pacientes e Métodos- As tipagens HLA-A, -B, -C foram realizadas em 92 pacientes com psoríase e 160 indivíduos sadios como grupo-controle através do DNA genômico, utilizando-se o método PCR/SSP. Desses 92 pacientes, com psoríase, foram tipados 70 pacientes e 71 indivíduos sadios para os microssatélites do TNF, classificados de acordo com o número de alelos (TNFa, b, c, d, e) e amplificados através do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase, visualizados em gel desnaturante de poliacrilamida, em condições específicas para cada loco.

Resultados- Dos 92 pacientes, 43,3% foram HLA-Cw*06 positivo ($p<0,0001$ e $OR=5.3$). Os alelos HLA-B*13, HLA-B*57, HLA-Cw*12 e os haplótipos HLA-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06 e HLA-B*39 Cw*12 mostraram-se aumentados nos pacientes com psoríase, com significância estatística ($p<0,05$), quando comparados ao grupo-controle de indivíduos sadios. Os microssatélites TNFa4, TNFb1, TNFe1 e o haplótipo TNFa2 b1 c2 d4 e1 mostraram-se com frequência diminuída e com significância estatística ($p<0,05$) nos pacientes com psoríase quando comparados ao grupo-controle de indivíduos sadios. O alelo HLA-B*13 e os haplótipos HLA-B*13 Cw*06, TNFa11 b4 c1 d3 e3, mostraram-se com frequências aumentadas e significância estatística ($p<0,05$) nos pacientes com psoríase tipo II quando comparados ao grupo-controle de indivíduos sadios. Também foi encontrado na comparação de pacientes psoríase tipo I com o grupo-controle de indivíduos sadios, um haplótipo estendido nessa região cromossômica, HLA-B*57 HLA-Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 c3, com significância estatística ($p<0,05$).

Conclusões- Esse estudo mostrou uma associação positiva entre os alelos HLA-B*13, HLA-B*57, Cw*06, Cw*12 e os haplótipos HLA-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06, HLA-B*39 Cw*12, TNFa11 b4 c1 d3 e3 e o haplótipo estendido HLA-B*57 Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 e3, determinando susceptibilidade para o desenvolvimento da psoríase. Também

foram encontrados os microssatélites TNFa4, TNFb1, TNFe1 e o haplótipo TNFa2 b1 c2 d4 e1 com associação negativa, sugerindo um fator de proteção na psoríase. Esses resultados apontam para o fato de que a detecção dos polimorfismos do HLA classe I e microssatélites no loco TNF poderiam ser marcadores de susceptibilidade e proteção genética na doença em pacientes brasileiros.

ABSTRACT

Introduction - Psoriasis is a genetic chronic inflammatory skin disorder with genes involved in disease predisposition located within the highly polymorphic Major Histocompatibility Complex (MHC) region on the chromosome 6p21.3. The goal of the present study was to identify, evaluate distribution and determine genetic associations of HLA class I genes and Tumor Necrosis Factor (TNF) microsatellites with psoriasis in Brazilian patients.

Patients and Methods - HLA-A, -B, -C typing was carried out in 92 psoriasis patients and 160 healthy individuals through genomic DNA using the PCR-SSP method. Typing of TNF microsatellites was carried out in 70 of the 92 psoriasis patients and in 71 healthy controls. TNF microsatellites were classified according to the number of alleles (TNFa, b, c, d, e) amplified through genomic DNA by polymerase chain reaction and visualized in denaturing polyacrylamide gel, in specific conditions for each locus.

Results - Of the 92 patients, 43.3% were HLA-Cw*06 positive ($p < 0.0001$ and $OR = 5.3$). HLA-B*13, HLA-B*57, HLA-Cw*12 alleles and HLA-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06 and HLA-B*39 Cw*12 haplotypes were found to be increased in patients with psoriasis, with a statistical significance ($p < 0.05$) when compared to healthy individuals. TNFa4, TNFb1, TNFe1 microsatellites and the TNFa2 b1 c2 d4 e1 haplotype showed a decreased frequency and a statistical significance ($p < 0.05$) in psoriasis patients when compared to healthy individuals. HLA-B*13 allele and HLA-B*13 Cw*06, TNFa11 b4 c1 d3 e3 haplotypes showed increased frequencies and a statistical significance ($p < 0.05$) in patients with type II psoriasis when compared to healthy individuals. We further found an extended haplotype in that chromosomal region, HLA-B*57 HLA-Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 c3, with a statistical significance ($p < 0.05$).

Conclusions - This study shows a positive association between the HLA-B*13, HLA-B*57, Cw*06, Cw*12 alleles and the B*13 Cw*06, B*57 Cw*06, B*39 Cw*12, TNFa11 b4 c1 d3 e3 haplotypes and the extended haplotype HLA-B*57 Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 e3, which determines susceptibility to the development of psoriasis. We further found TNFa4, TNFb1, TNFe1 microsatellites and the TNFa2 b1 c2 d4 e1 haplotype with negative association, which suggests a protection factor against psoriasis. Results point to the fact that detection of HLA class I polymorphisms and microsatellites in the TNF locus may be

markers of either genetic susceptibility, or protection against the disease in Brazilian patients.

r

1- INTRODUÇÃO

1.1- Psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória, recorrente, com hiperproliferação e recrutamento de linfócitos T e células mononucleares na pele afetada (FARBER et al., 1974; MARTINEZ-BORRA et al., 2003). O termo psoríase é derivado do grego, *psora* (descamação, prurido, vermelhidão, erupção). A primeira descrição foi por Willan (1808 *apud* , BOWCOCK e COOKSON, 2004) e a designação epônima dessa condição dermatológica foi proposta por RUSSEL (1950 *apud*, BOWCOCK e COOKSON, 2004). A doença é caracterizada pela proliferação anormal e alterações complexas na diferenciação da epiderme, com muitas anormalidades bioquímicas, imunológicas, inflamatórias e vasculares. Recentemente vem sendo compreendida como uma doença imunológica e representa uma das doenças autoimunes mais comuns mediadas por células T (SAMPAIO e RIVITTI, 2000; BOYMAN et al., 2004). A evolução é crônica e raramente fatal. É uma doença socioeconômica importante que afeta o comportamento e o convívio social. A distribuição mundial e a prevalência variam de acordo com a etnia e localização geográfica e é, no norte da Europa e Estados Unidos (USA) em torno de 2% e na China de 0,12% da população afetada. (CHRISTOPHERS e KRUGER, 1987; YANG et al., 2004). No Brasil, segundo o Centro Brasileiro de Psoríase-CBP (2004), a prevalência estimada é de três milhões da população. Homens e mulheres são acometidos na mesma frequência (BARKER, 2001). O diagnóstico da doença baseia-se no achado clínico que, na maioria das vezes, é típico. Apenas em algumas ocasiões, nas manifestações mais graves ou nas formas não usuais, é necessário biópsia para confirmação.

1.1.1- Manifestações clínicas

A psoríase pode ser classificada em cinco grandes grupos (SAMPAIO e RIVITTI, 2000; CHRISTOPHERS, 2001; YANG et al., 2004):

Psoríase em placas (ou psoríase vulgar)

É a forma mais comum, observada em quase 90% dos doentes. Manifesta-se por placas eritemato-escamosas bem delimitadas, de tamanhos variados, afetando, geralmente, de forma simétrica a face de extensão dos membros, particularmente joelhos e

cotovelos, couro cabeludo e região sacra. O número das lesões é muito variável, de uma a centenas, sendo que qualquer área da pele pode estar acometida. Com menor frequência, pode atingir as dobras flexurais (psoríase invertida). Eventualmente, são afetadas as mucosas genitais ou mucosas dos lábios.

Nas lesões de psoríase, às vezes, predomina o eritema, outras a descamação, formada por escamas secas, branco-prateadas, aderentes e estratificadas. Há, no entanto, uma uniformidade no aspecto clínico das lesões como o comprometimento das unhas, que apresentam pequenas depressões (unha em dedal). Onicólise e hiperqueratose sub-ungueal são também observadas. Eventualmente, ocorrem sintomas subjetivos como prurido e queimação que, de acordo com o estado emocional do doente, atingem intensidade variável. A evolução é crônica, com períodos de exacerbação e de acalmia, quando podem ser observadas lesões anulares, características do quadro em remissão. Dois importantes sinais clínicos podem ser observados através da curetagem metódica de Brocq:

- a- Sinal de vela quando, pela curetagem, destacam-se escamas semelhantes às encontradas na raspagem de uma vela.
- b- Sinal do orvalho sangrante ou de Auspitz quando, pela continuação da raspagem, após a retirada das escamas, encontra-se uma superfície vermelho brilhante com pontos hemorrágicos.

Psoríase em gotas

Mais comum em crianças, adolescentes e adultos jovens, manifesta-se pelo aparecimento súbito de pequenas pápulas eritemato-descamativas de 0,5 a 1,5 cm de diâmetro, geralmente localizadas no tronco e extremidades proximais dos membros. Como característica, a psoríase gutata é precedida por infecção estreptocócica ou viral comum, acompanhando quadro de rinofaringite. O prognóstico nas crianças é bom, melhor do que nos adultos e costuma resolver-se espontaneamente, em semanas ou meses. Às vezes, as lesões podem persistir, aumentar de tamanho, tomando as características da psoríase em placas.

Psoríase eritrodérmica

É caracterizada por eritema intenso, de caráter universal, acompanhado de descamação discreta. Geralmente acomete 75% ou mais da superfície corpórea. A eritrodermia pode ocorrer no curso evolutivo da doença. Mais freqüentemente, é desencadeada por terapias intempestivas, por administração e posterior interrupção de corticóide sistêmico, podendo corresponder à exacerbação da doença em doente com aids.

Na psoríase eritrodérmica, a atividade do processo psoriático é intenso, com proliferação aumentada e perda da maturação das células epidérmicas, levando à produção de queratinas anormais. Dessa forma, a descamação é discreta e predomina o eritema. Pela vasodilatação generalizada, há perda excessiva de calor levando à hipotermia. O quadro clínico em geral é grave e associado com fadiga, dores musculares, anemia, desidratação, deficiência de ferro e de proteína. Nos casos de longa evolução, podem ocorrer diminuição do débito cardíaco e até mesmo comprometimento da função hepática e renal.

Psoríase pustulosa

Forma generalizada:

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

Forma localizada:

Compreende três subformas, uma com lesão única ou algumas lesões com pústulas que, em geral, não evolui para a forma generalizada. Outra subforma com lesões nas extremidades dos dedos das mãos e ou artelhos, conhecida como no passado com a denominação de acrodermatite contínua de Hallopeau, que é uma doença rara, crônica e ocasionalmente o quadro evolui para psoríase pustulosa generalizada. A terceira subforma,

a pustulose palmoplantar abacteriana, manifesta-se por áreas bem definidas de eritema, descamação e pústulas, geralmente bilaterais e simétricas nos cavos plantares e/ ou plantas.

Psoríase artropática

Ocorre em 5 a 7 % dos doentes de psoríase, em geral naqueles com lesões cutâneas disseminadas. A forma mais freqüente é uma mono ou oligoartrite assimétrica de fácil controle e bom prognóstico, que afeta particularmente as articulações interfalangeanas distais ou proximais. A velocidade de hemossedimentação está aumentada; porém o fator reumatóide e os fatores antinucleares estão ausentes. Em 75% dos casos a psoríase na pele antecede a artrite, em 15% o início é sincrônico, em 10% a artrite precede o quadro cutâneo.

Os achados de HENSELER e CHRISTOPHERS (1985), definiram na psoríase, embora clinicamente similar, dois tipos ou formas distintos, que diferem na idade de início, história familiar, antígenos HLA e evolução da doença, conduzindo para a hipótese de duas formas da doença:

Psoríase tipo I

O início precoce da doença, com menos de 40 anos de idade, ocorre em 70% dos pacientes e é denominada de psoríase tipo I. Usualmente é associada com história familiar e com genes HLA de classe I, particularmente o HLA-Cw6. Nesses pacientes, a primeira manifestação ocorre comumente na terceira década, com um pico de idade para o surgimento da doença de 20-30 anos (HENSELER e CHRISTOPHERS, 1985; JENISCH et al., 1995; BARKER, 2001).

Psoríase tipo II

O início tardio (tipo II), após os 40 anos de idade, com história familiar negativa, ocorre esporadicamente, é caracterizada somente por uma fraca correlação com os antígenos HLA. O pico de idade para o início da doença tem sido descrito como de 50-60 anos, com um pico menor quando comparado ao pico da psoríase tipo I (HENSELER e CHRISTOPHERS, 1985; CHRISTOPHERS e HENSELER, 1992; KUNDAKÇI et al., 2002).

1.1.2- Etiopatogenia

A causa da psoríase é desconhecida e pelo que se conhece até o momento, o modo de herança é multifatorial. Uma das hipóteses é a predisposição genética, com envolvimento de diversos genes e aproximadamente um terço dos pacientes tem pelo menos um parente de primeiro ou segundo grau afetado (BARKER, 2001). Estudos em gêmeos mostraram uma concordância de 63% em homozigotos comparados com 15% para os gêmeos dizigotos, correspondendo a uma estimativa de hereditariedade de 91%, evidenciando que a concordância não é de 100%, indicando, dessa forma, envolvimento de fatores externos desencadeantes, que também desempenham função importante na expressão da doença (BOWCOCK e BARKER, 2003). Os fatores implicados em seu aparecimento ou exacerbação são: traumas cutâneos, infecções (estreptococo β hemolítico), drogas e estresse psíquico (SAMPAIO e RIVITTI, 2000; CHRISTOPHERS e MROWIETZ, 1999).

A célula alvo do defeito básico na psoríase ainda é desconhecida. Estudos histológicos de avaliação das lesões da psoríase revelam dois fatores proeminentes: hiperplasia da epiderme e o infiltrado inflamatório, conforme ilustra a Figura 1. As lesões em forma de placa na pele consistem de hiperplasia, microabscessos de Munro e diferenciação incompleta de queratinócitos, todos esses fatores contribuindo para formação de placas escamosas elevadas. O infiltrado inflamatório dérmico é composto na grande maioria por células T (FERENCZI et al., 2000).

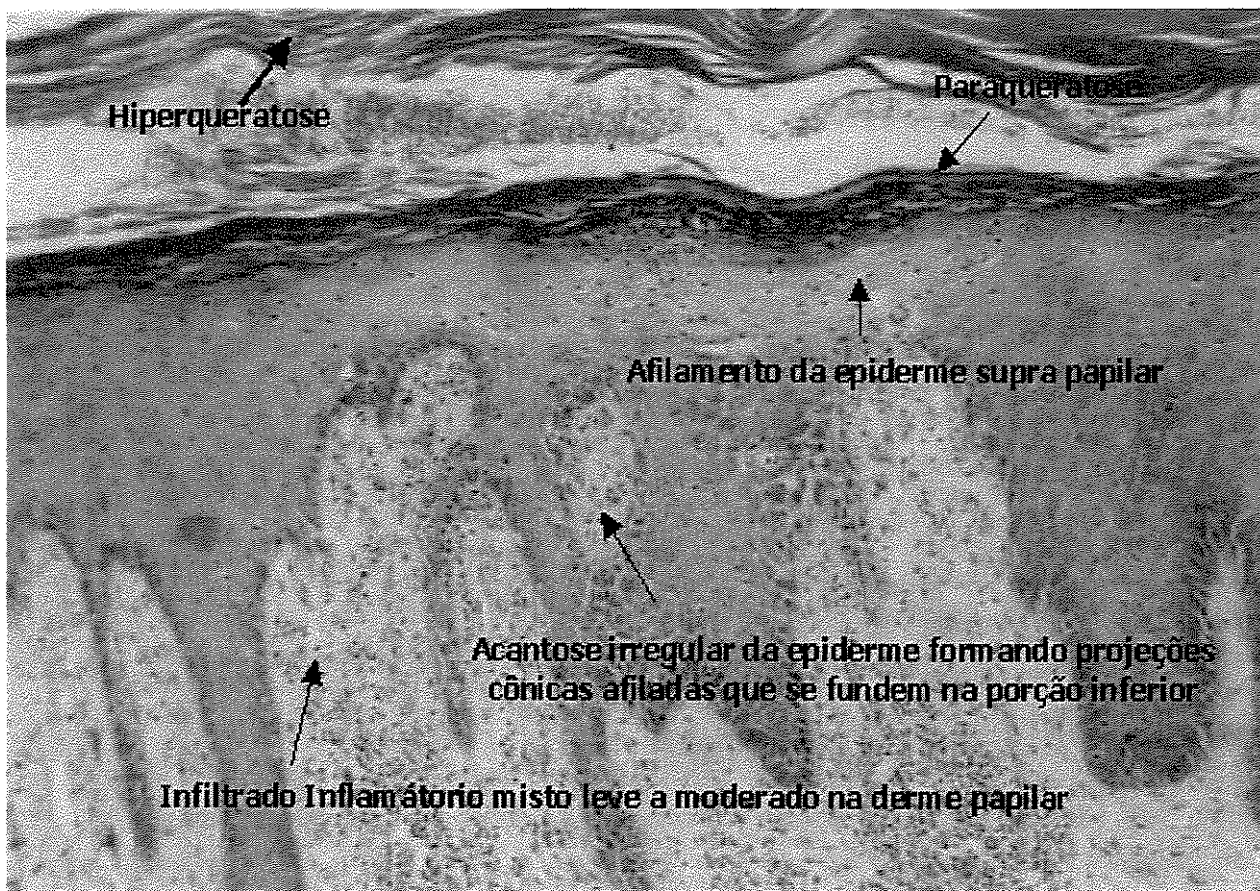


Figura 1- Avaliação histológica da lesão (du Vivier, 1977).

1.1.3- Hipóteses na patogênese

Os primeiros estudos relacionados à psoríase tiveram início em meados do século XIX. A partir dos anos 70, com a imunologia celular apresentando grande desenvolvimento, a doença foi fortemente associada às células brancas do sangue (VALDIMARSSON et al., 1986).

Investigações posteriores enfatizaram a presença e a importância funcional das células T nas lesões psoriáticas (CHANG et al., 1994). As hipóteses atuais da mediação imune evidenciam um papel central das células T, envolvendo um infiltrado inflamatório celular na derme e epiderme do paciente com psoríase, consistido predominantemente de células T (BJERKE et al., 1978; BOS e DE RIE, 1999). No entanto, a histologia da lesão

revela três alterações principais: diferenciação anormal e hiperproliferação de queratinócitos e infiltrado de células inflamatórias. Na epiderme normal a célula basal se divide uma vez a cada 13 dias e permanece a maior parte do tempo na fase G1 do ciclo celular. A maturação e o destacamento de um novo queratinócito demora 26 dias. Diferentemente, o ciclo celular de um queratinócito na placa psoriática é encurtado para um dia e meio, e a maturação e fase de destacamento, para quatro dias. O aumento da síntese de DNA na epiderme psoriática mantém-se também depois de cessada a inflamação (ELDER et al., 1994; SAMPAIO e RIVITTI, 2000). Os queratinócitos contém grande variedade de citocinas imunes e moduladores da inflamação, que são liberados após dano à pele, tais como interleucinas (IL), TNF- α , fatores estimuladores de formação de colônias, fatores de crescimento. A IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF- α são geralmente pró-inflamatórios, fato que pode explicar o infiltrado observado e a presença de imunócitos na lesão. A função biológica do TNF α é complexa e está relacionada com a concentração e duração da exposição ao TNF α (HAJEER e HUTCHINSON, 2000). Na situação aguda, a produção local de TNF α é claramente benéfica. Ela aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular permitindo que células imunes, em particular neutrófilos e macrófagos, cheguem aos locais de inflamação e dano tecidual (BARBARA et al., 1996; GAMBLE et al., 1985). As evidências mais fortes, na patogênese, apontam para a interação dos seguintes componentes: as células T, o perfil das citocinas, a apresentação do antígeno, os superantígenos, os leucócitos da epiderme e as associações nos genes do CPH (MOSSMAN et al., 1986).

O provável papel da autoimunidade na psoríase é um conceito em desenvolvimento e necessita de novos esclarecimentos (BOS e DE RIE, 1999). Muitos trabalhos defendem a idéia da ativação das células T no início da doença e a continuidade do processo pode ser relacionado à ativação das células T CD4+ e sua manutenção pela proliferação dos queratinócitos da epiderme (STRANGE et al., 1993). Na continuidade dessa ativação pelas células T CD8+, propicia a ligação do CPH classe I e classe II (GOTTLIEB e KRUEGER, 1994). A combinação exata de citocinas ou fatores de crescimento na subsequente ativação da célula T e proliferação dos queratinócitos ainda é incerta, porém evidências consistentes apontam para o perfil Th1, no qual o γ -interferon é um componente vital (HANCOCK et al., 1988).

Interações das células T e queratinócitos

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

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

Os mecanismos antígenos-dependentes de amplificação e persistência da inflamação envolvem as células T- Langerhans ou interações dos macrófagos com células da derme que podem dar continuidade ao processo (BAADSGAARD et al., 1989). Tem sido proposto que, na psoríase, ocorre uma estimulação persistente das células T ou da apresentação de antígenos estranhos pela células apresentadoras de antígenos ou de uma autoreatividade (VALDIMARSSOM et al., 1986). Foi constatado que o infiltrado, presente na derme de pacientes com lesões psoriáticas, contém muitos linfócitos T “helper” antígeno-reativos (MORGANROTH et al., 1991).

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

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

Superantígenos

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

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

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

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

1.2- Genética da psoríase

As associações genéticas na psoríase foram identificadas em estudos através de um amplo número de famílias com a psoríase, desde 1960, sugerindo que a doença é herdada com característica autossômica dominante ou poligênica (WARD e STEPHENS, 1961; ABELE et al., 1963). Estudos genéticos confirmam que indivíduos com a psoríase podem herdar a predisposição genética (BOWCOCK e BARKER, 2003). Nos últimos anos, grupos de pesquisadores têm investigado a base genética na psoríase, em particular, a análise genética do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) no cromossomo humano. Em desequilíbrio de ligação na psoríase, foi estimado que a presença de gene ou genes de susceptibilidade no intervalo designado como PSORS1 (mapeado a 12 cM no cromossomo 6p21.3), são responsáveis por 30-50% da contribuição genética à doença (TREMBATH et al., 1997). Nesse intervalo, que compreende o CPH, no qual estão localizados os genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA), estudos mostraram associação da psoríase com certos alelos de classe I e II do CPH, o HLA-B13, HLA-B57, HLA-Cw6, HLA-DR7 (NAIR et al., 2000). Baseado em estudos de associação da doença foi proposto o gene que confere a susceptibilidade para psoríase no PSORS1 é o HLA-C, mais particularmente uma variante do alelo HLA-Cw6 (BARKER, 2001). Alternativamente, a associação das moléculas HLA na psoríase pode ser indireta, e resultar de um desequilíbrio de ligação com um possível gene, em outro lugar do cromossomo 6 (TREMBATH et al., 1997). Muitos genes igualmente localizados na região HLA, cujos produtos também sugerem um envolvimento com a patogênese da psoríase, incluem o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e β (LT- α ou TNF- β) (BALENDRAN et al., 1999). O TNF- α e o TNF- β são citocinas envolvidas na resposta inflamatória. Vários polimorfismos foram identificados dentro ou ao redor do gene TNF- α , na região de classe III do CPH e estudos indicam que estes polimorfismos têm relação com o nível de produção da citocina TNF- α , que apresenta mediação importante na resposta inflamatória (HAJEER e HUTCHINSON, 2000).

1.2.1- O complexo principal de histocompatibilidade

Inicialmente as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade eram referidas como antígenos de transplantação por terem sido descobertas no contexto dos transplantes, com influência na rejeição do enxerto e com o papel central na apresentação de antígenos para linfócitos T. As observações iniciais na discriminação entre o tecido “próprio” e “estranho” foram realizadas nos estudos pioneiros de GORER et al., 1937, usando enxertos de peles e tumores de camundongos e, mapeados na região do CPH, conhecida como H-2 no camundongo, localizada no cromossomo 17. Nos humanos são conhecidas como antígenos leucocitários humanos (HLA), codificados no braço curto do cromossomo 6 (posição 6p21.3) (VAN ELS et al., 1992). As moléculas HLA de classe I e II são glicoproteínas de superfície celular estreitamente relacionadas quanto à função e à estrutura geral. Apresentam três porções: uma citosólica, uma transmembrana e a porção extracelular responsável pela apresentação de antígenos e interação com o receptor de célula T (TCR).

As moléculas de classe I, expressas praticamente em todas as células nucleadas, são formadas por duas cadeias polipeptídicas não covalentemente ligadas: a cadeia α , codificada por genes do CPH (cadeia pesada) de 46 kDa e a cadeia não polimórfica β 2 microglobulina (β 2m) de 12 kDa, codificado por um gene situado no cromossomo 15q21. A cadeia pesada é composta pelos domínios extracelulares α 1, α 2 e α 3, seguida por regiões transmembrana e citoplasmática, cada uma codificada por exons separados (SODOYER et al., 1984; STRACHAN et al., 1984). Há um extenso polimorfismo alélico dos genes HLA-A, -B, -C que está localizado nos domínios α 1 e α 2 (PARHAM et al., 1988) e a significância funcional tornou-se mais clara, quando a estrutura tridimensional da molécula HLA-A2.1 foi revelada (BJORKMAN, et al., 1987a,b). Os domínios α 3 e β 2m assemelham-se ao domínio da imunoglobulina-like clássica. Em contraste, os domínios α 1 e α 2 têm uma única estrutura, que está adaptada para as funções da molécula.

A região situada entre os domínios α 1 e α 2 é a mais polimórfica e sua estrutura é constituída por 8 folhas β -pregueadas, apoiando duas fitas paralelas de α -hélices. Isso forma a fenda de ligação do peptídeo das moléculas de classe I. O tamanho da fenda permite ligar peptídeos de 8 a 11 aminoácidos. O segmento α 3 da cadeia α enovela-se em

um domínio Ig, sendo importante durante a apresentação de antígenos a célula T, pois é nessa região que se liga a molécula CD8. A $\beta 2m$ interage não-covalentemente com o domínio $\alpha 3$ da cadeia α que são estruturalmente homólogos a um domínio Ig, invariável entre todas as moléculas de classe I (BJORKMAN e PARHAM, 1990).

As moléculas de classe I ligam-se preferencialmente a peptídeos de origem citosólica (peptídeos virais, tumorais ou próprios). Esses peptídeos são produzidos através da atividade proteolítica das proteases 2 e 7 (LMP2 e LMP7) e são transportados via TAP 1 e 2 (transportadores 1 e 2 do processamento de antígeno) ao retículo endoplasmático e assim ligados às moléculas HLA classe I previamente sintetizadas como ilustra a Figura 2. O complexo HLA-1/peptídeo é estável e pode ser transportado até a membrana plasmática (NEEFJES e MOMBURG, 1993; ROCK et al., 1994; KUCKELHORN et al., 1995).

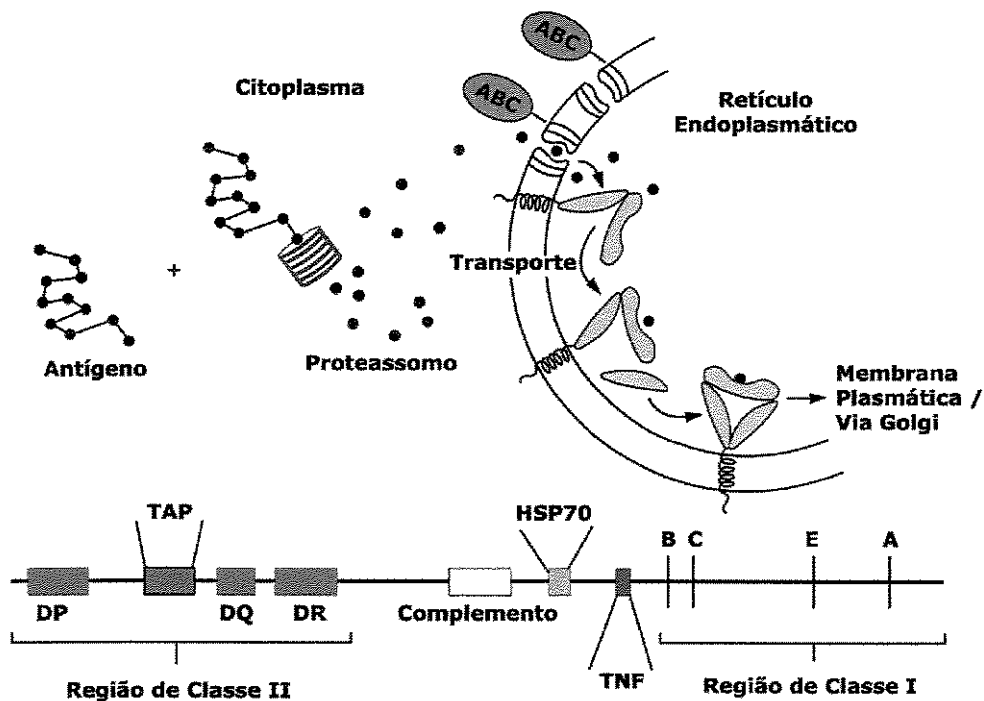


Figura 2- Modelo proposto das estruturas e funções do TAP1 e TAP2 e o complexo proteossomo, com as localizações intracelular e genética e a ilustração da degradação de proteínas (pontos pretos), seu transporte para o retículo endoplasmático e interação com a molécula do CPH de classe I. É também ilustrado, a localização dos genes que codificam o TAP e os componentes do complexo proteossomo, dentro da região de classe II (PARHAM, 1996).

As moléculas de classe II, são formadas pela união não covalente de duas cadeias polimórficas, uma cadeia α de 35 kDa e a cadeia β de 27 kDa (CRESSWELL e GEIER, 1975), codificadas por genes do CPH e expressas apenas em células apresentadoras de antígenos (APC), como por exemplo linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células do epitélio tímico como mostra a Figura 3. Essas moléculas estão não covalentemente associadas e cada cadeia α e β contém dois domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$, $\beta 2$), também uma região transmembrana e um domínio citoplasmático. A variação individual na expressão das moléculas de superfície celular de classe II é gerada por variações nas cadeias $\alpha\beta$, particularmente nas heterozigoses do CPH (BRAUNSTEIN e GERMAIN, 1987). O domínio $\beta 2$ é o local no qual se liga a molécula CD4 durante a apresentação. Os segmentos aminoterminais $\alpha 1$ e $\beta 1$ das cadeias de classe II interagem para formar a fenda de ligação ao peptídeo, que assemelha-se estruturalmente a fenda da molécula de classe I. As moléculas de classe II ligam-se preferencialmente a peptídeos de origem extracelular, oriundos de proteínas capturadas pela célula e clivadas em vesículas enzimáticas. A ligação dos peptídeos à molécula de HLA dá-se em vesículas especiais, processo que conta com o auxílio da molécula de HLA-DM, também codificada pelo CPH. Após a ligação do peptídeo, o complexo HLA-II/antígeno é estabilizado e transportado até a superfície celular (MONACO, 1992). Na superfície celular, as moléculas HLA irão exercer sua função de apresentação de antígenos e interação com o receptor de célula T (TCR). Esses receptores têm especificidade para fragmentos de peptídeos de um antígeno e de moléculas do CPH, o qual está ligado, como mostra esquematicamente a Figura 3. Os TCR são formados por duas cadeias de heterodímeros codificados por genes, com as moléculas Ig-like (YANCOPOULOS et al., 1986) e rearranjado para elevar as muitas especificidades. A interação de antígenos com o TCR ocorre desde a seleção tímica, na qual os linfócitos T que se ligam com afinidade ao complexo HLA/peptídeo próprio são selecionados positivamente, enquanto os linfócitos T que não reconhecem ou não se ligam com alta afinidade a esse complexo são delidos; até a ativação dos linfócitos T maduros (ABBAS e LICHTMAN, 2003)

Dessa forma, a natureza polimórfica das diferentes especificidades alélicas das moléculas classe I e II origina uma profusão de fragmentos peptídicos, os quais são capazes de uma eficaz associação com as moléculas do CPH, na fenda de ligação do peptídeo

(RUDENSKY et al., 1992). O polimorfismo do CPH aumenta a amplitude de antígenos que, potencialmente, podem se ligar aos antígenos classe I e II, resultando desse modo em respostas imunes, mais efetivas e compreensivas (CHICZ et al., 1992).

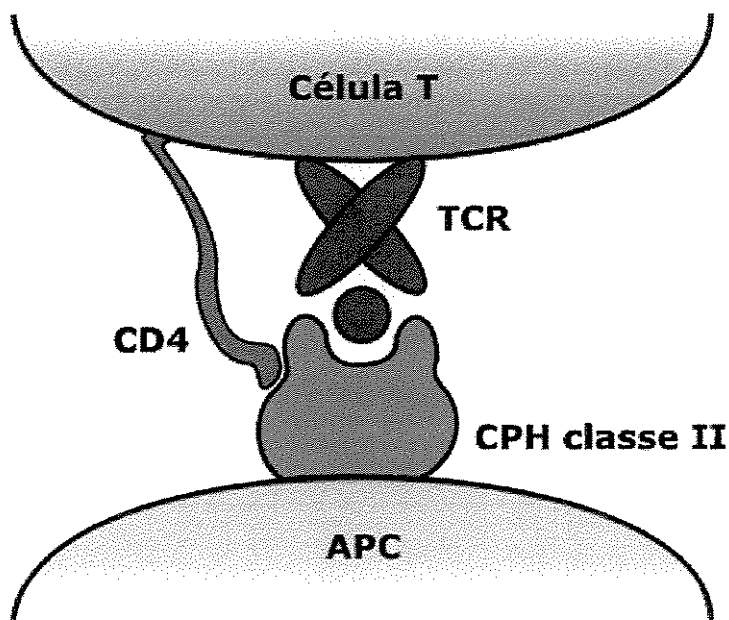


Figura 3- Representação esquemática do complexo molecular quaternário, ilustrando a interação simultânea TCR e o co-receptor CD4, com a molécula de classe II do CPH ligada ao peptídeo (SAIZAWA et al., 1987).

1.2.1.1- Organização genética do CPH

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

Os genes da região de classe I constituem a porção mais telomérica do loco HLA, codificam os antígenos HLA-A, -B, -C. Os genes da região de classe II são os mais centroméricos no loco HLA e codificam os antígenos HLA-DR, -DQ e -DP. Entre essas duas regiões está a região de classe III caracterizada pela presença de genes que codificam vários componentes do sistema complemento, genes do TNF α e TNF β , e da proteína do Choque Térmico (HSP 70) (VERJANS et al., 1991; BODMER, 1997) conforme a Figura 4.

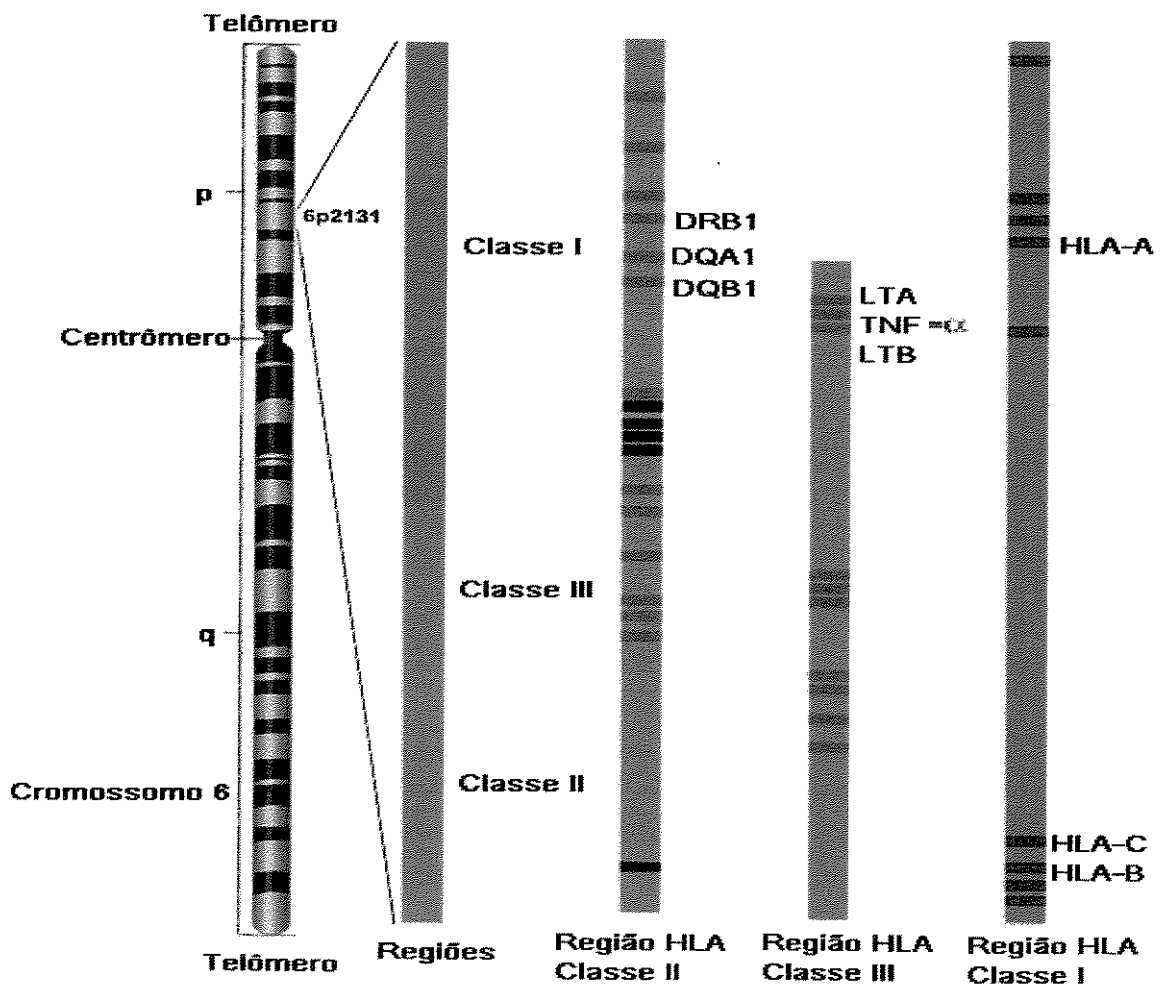


Figura 4- Mapa simplificado do CPH no cromossomo 6 (KLEIN e SATO, 2000).

1.2.1.2- Polimorfismo do CPH

Cada indivíduo pode ter dois diferentes alelos para cada gene. Esses alelos se expressam concomitantemente. Isto é, cada um dos alelos codifica uma molécula de proteína do CPH diferente, que poderá ser expressa na superfície da célula. Na população, existe um grande número de alelos diferentes, os quais são traduzidos para muitas proteínas diferentes, resultando em alto grau de polimorfismo (PARHAM et al., 1988). É importante mencionar que cada indivíduo pode herdar somente dois alelos (um de cada um dos pais) para cada um dos três genes de classe I e para cada um dos três genes de classe II. O alto grau de polimorfismo é encontrado na população e não no indivíduo (PARHAM et al., 1988).

1.2.1.3- Herança dos genes do CPH

Os genes do CPH são “intimamente ligados”, isto é, estão localizados muito próximos, no braço curto do cromossomo 6. Durante a meiose, existe somente uma pequena chance de ocorrer um “cross-over” entre genes. Assim eles são, usualmente, herdados em bloco havendo uma chance de um em cada quatro de que os irmãos possam ter os mesmos alelos HLA. Todo indivíduo expressa alelos do CPH em ambos os cromossomos que são herdados dos pais e isso maximiza o número de moléculas do CPH disponível para ligar peptídeos na apresentação às células T (JANEWAY et al., 1997). Outra característica dos genes HLA é o desequilíbrio de ligação, isto é, para preservar determinados haplótipos, a frequência observada de um dado alelo é maior que a esperada por combinação de alelos ao acaso (YANG et al., 2004).

1.2.1.4- Identificação dos genes na doença

Susceptibilidade genética

A maioria das doenças que afetam os humanos não ocorrem pelo evento de um simples gene. No CPH associado à doença isso é reafirmado. Assim, um simples alelo HLA não está associado 100% para à doença e, conseqüentemente, as doenças são multigênicas e envolvem múltiplos fatores ambientais, descritas como multifatoriais com peculiaridades

complexas. Para assegurar, a existência de componentes genéticos e identificar os genes de susceptibilidade à doença, é usualmente estimado o estudo do índice de concordância nos gêmeos idênticos comparados com gêmeos não idênticos e a estimativa da razão de risco (TIWARI e TERASAKI, 1988). Quando um componente genético significativo é estabelecido, o próximo objetivo é identificar a região cromossômica ou intervalo que teriam papel na etiologia da doença.

Estudo de associação

No estudo de associação, a frequência de um alelo em uma amostra de indivíduos afetados é comparada com a frequência do grupo-controle. O maior problema com esse tipo de estudo está na população do grupo-controle, que é a mais comum fonte de dados de falsa associação. Por essa razão, a população grupo-controle deve ser selecionada considerando a etnia, idade e fatores ambientais. Em geral, estudos de associação são realizados para os genes candidatos com uma possível função biológica no processo de patofisiologia da doença investigada, portanto em doenças imunes, especialmente as autoimunes (estudo dos Antígenos Leucocitários Humanos - HLA). A associação, contudo, não é a causa, mas é possível que o alelo que tem associação positiva com a doença esteja em desequilíbrio de ligação com o gene de susceptibilidade (LANDER e SCHORK, 1994).

Análise de ligação

A ligação descreve a tendência de dois marcadores ou genes serem herdados juntos. Em geral, isso é esperado para os dois marcadores no mesmo cromossomo, pois estão fisicamente ligados. Entretanto, a segregação de dois marcadores dentro de uma família pode também ocorrer como resultado da *epistasis* (interação entre diferentes genes) e, dessa forma, uma ligação genética. Em um estudo de ligação, um dos marcadores é o fenótipo da doença e a análise é baseada na hipótese de herança, dominante ou recessivo e o nível de penetrância (BARKER, 2001).

1.2.2- Associação do HLA na psoríase

O primeiro a relatar uma associação do HLA com a psoríase foi RUSSELL et al., 1972, que observou os alelos HLA-B13 e HLA-B17 (57) presentes em 27,3% e 22,7% nos pacientes, comparados com 3,4% e 9,0% no grupo-controle de indivíduos sadios. Depois BRENNER et al., 1978 observou um outro alelo fortemente associado com a psoríase, o alelo HLA-Cw6.

O haplótipo HLA-Cw6-B57-DRB1*0701/02-DQA1*0201-DQB1*0303 foi observado por SCHMITT EGENOLF et al., 1996, associado com a doença e JENISCH et al., 1995, mostrou associação com haplótipo HLA-DRB1*0701/02-DQA1*0201-DQB1*0303. Os alelos HLA-Cw6, HLA-B13, HLA-B57, DRB1*0701/02, DQB1*0201 e DQB1*0303 mostraram-se mais associados à psoríase, com um risco relativo (RR) maior para esses alelos HLA (SCHMITT EGENOLF et al., 1993). Esses estudos indicam que o desequilíbrio de ligação do sistema HLA, junto aos eventos de recombinação, poderiam mudar os haplótipos no qual o HLA-Cw6 está presente. Dessa forma, a associação do alelo HLA-Cw6 com HLA-B13 ou HLA-B57, poderiam indicar que esses haplótipos são também envolvidos, de alguma forma, com a susceptibilidade à doença, ou ainda, a um outro gene associado com a psoríase localizado próximo desses genes.

1.2.3-Fator de necrose tumoral

O TNF- α e TNF- β são citocinas envolvidas nas reações imunes celular e inflamatórias e são produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos ativados (MATTHIAS, 1998). A função biológica é complexa e está relacionada com a concentração e duração da exposição ao TNF- α , que nos processos agudos é claramente benéfica, aumentando a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular permitindo que células imunes cheguem ao local de inflamação e do dano tecidual, entretanto a exposição sistêmica ou prolongada pode ser maléfica. Altos níveis de TNF- α estão associados ao choque tóxico induzidos por endotoxinas bacterianas (TRACEY, 1986).

1.2.3.1- Microssatélites do TNF

Devido à frequência, alto polimorfismo alélico e facilidade tecnológica, os microssatélites são marcadores muito usados no estudo do mapa genético (LOVE et al., 1990; DIB et al., 1996). A maior parte do genoma eucarioto contém seqüências repetidas que são herdadas, de modo estável, de geração para geração (CHARLESWORTH et al., 1994). Os polimorfismos de DNA caracterizados pela repetição consecutiva (*in tandem*) de uma seqüência de nucleotídeos que varia em número de indivíduo para indivíduo em um determinado loco, são chamados de VNTRs (“Variable Number of Tandem Repeats”). Estes marcadores contêm muitos alelos em cada loco, o que não é devido à presença ou ausência de sítios de restrição, mas sim à variabilidade do número de repetições entre dois pontos no genoma (SCHUMM, 1996).

Os VNTRs que apresentam seqüências repetidas de 11 a 60 pares de bases (pb) são conhecidos como minissatélites (NAKAMURA et al., 1987); quando estas seqüências apresentam de 2 a 6 pb elas são chamadas de Repetições Curtas *in tandem* (“Short Tandem Repeats” - STRs) ou microssatélites. No genoma humano encontra-se aproximadamente um STR a cada 6 kilobases (HEARNE et al., 1992). A distribuição dos STRs, como sua expansão ou contração, dentro do genoma parece estar diretamente relacionada ao ganho ou perda de função gênica. De acordo com a sua localização, os STRs podem afetar desde a replicação do DNA, a transcrição do RNA como o seu processamento, até o transporte do RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma (LI et al. 2004). Na região do TNF, encontram-se seis STRs, como ilustra a Figura 5, que possuem alelos que estão relacionados com maior ou menor produção da citocina, podendo afetar a resposta imunológica a um determinado agente (HAJEER e HUTCHINSON, 2000).

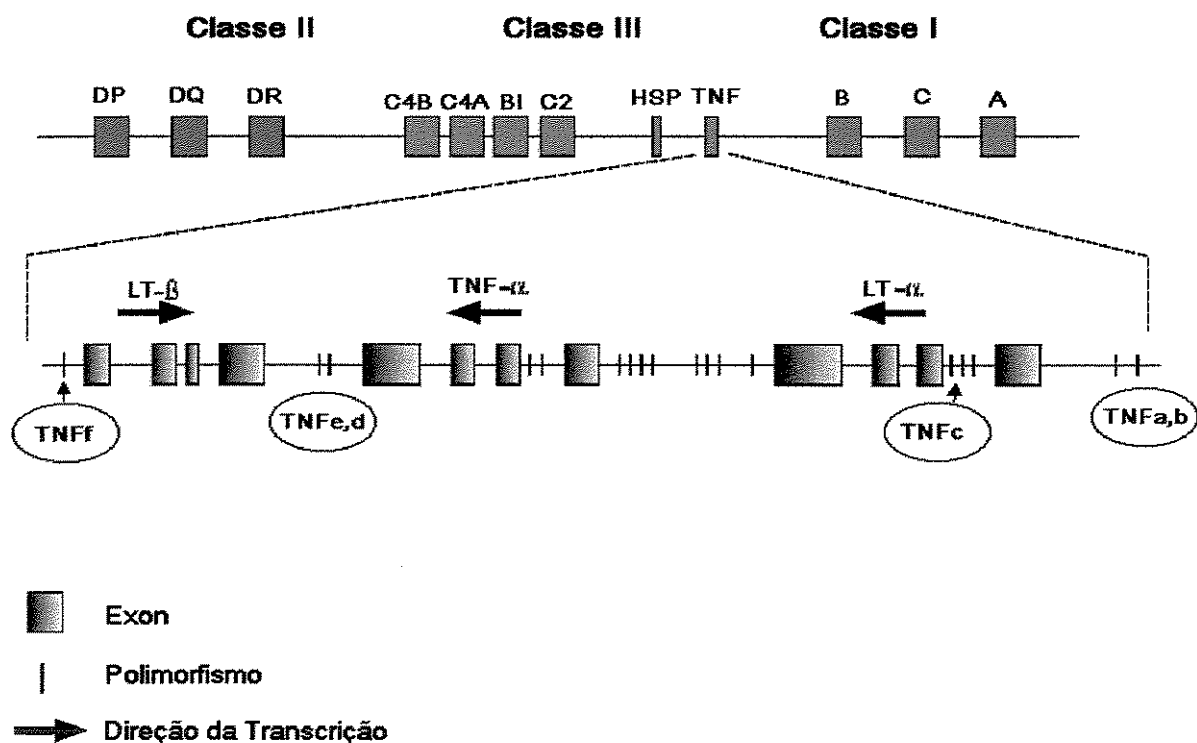


Figura 5- Polimorfismo do loco TNF com os cinco STRs (HAJEER & HUTCHINSON, 2000).

Esses marcadores são utilizados em estudos genéticos de associação ou ligação na busca de susceptibilidade ou resistência. A região gênica que codifica os TNFs tem cerca de 12 Kb de comprimento e contém várias áreas polimórficas, entre elas estão seis STRs e diversos pontos de mutação, particularmente na região promotora em população caucasiana e a mais comum é de G-A na posição -308 e -238 (D'ALFONSO e RICHIARDI, 1996), como mostra a Figura 6. Os microssatélites do TNF são denominados TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe, TNFf (UDALOVA et al., 1993; TSUKAMOTO et al., 1998), sendo que, os TNFs a e b são repetições (GT)_n e (GA)_n, respectivamente, localizados aproximadamente 3,5 Kb teloméricas ao gene TNF-β. O TNFc é uma repetição (GA)_n localizada dentro do primeiro intron do gene TNF-β. Os outros dois STRs, TNFd e TNFe, são repetições (GA)_n situadas entre 8 e 10 Kb centroméricas ao gene TNF-α e

abaixo do gene TNF- β (JONGENEEL, 1991; NEDOSPASOV et al., 1991) e o TNF β é uma repetição (CA) n localizada acima do gene da LT- β , como mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Características dos STRs do gene TNF.

Microssatélite	TNFa	TNFb	TNFc	TNFd	TNFe
Seqüência Repetitiva	(GT) n	(GA) n	(GA) n	(GA) n	(GA) n
Tamanho dos Fragmentos	99-125	125-131	159-161	124-136	98-102
Número de alelos	14	7	2	7	3

(UDALOVA et al., 1993; HAJEER e HUTCHINSON, 2000)

1.2.3.2- Associação dos microssatélites TNF e doenças

Vários estudos têm demonstrado o forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do TNF e os genes do CPH de classe I e II. Contudo, os trabalhos sobre a influência dos polimorfismos sobre a expressão gênica e, conseqüentemente, a sua participação em várias doenças são controversos e inconclusivos (HAJEER e HUTCHINSON, 2001).

Os STRs do TNF têm sido associados a várias doenças auto-imunes. Em indivíduos caucasianos com lupus eritematoso sistêmico (LES), os TNFa2, TNFb1 e TNFd3 mostraram-se parte do haplótipo HLA-A1 –B8 –DRB1*0301, que é conhecido por aumentar o nível do TNF α e nessa população o haplótipo não foi associado com complicações renais do LES (HAJEER et al., 1997). Em pacientes gregos com LES houve aumento na freqüência do alelo TNFa11, que mostrou-se em desequilíbrio de ligação com o HLA-DRB1*15 (TARASSI et al. 1998) e em pacientes com artrite reumatóide (AR), HAJEER et al., 1996 foram os primeiros a demonstrar a associação da doença com o TNFa6. O TNFa6, TNFb5, TNFc1 e TNFd4 foram associados ao HLA-DRB1*0401 e HLA-B44 (HAJEER et al. 1996). Na esclerose múltipla (EM) estudos com os STRs do TNFa, b, c mostraram que a distribuição dos alelos TNFa11 e TNFb4 foi mais freqüente nos pacientes do que no grupo controle (KIRK et al., 1997). Na diabetes tipo I foi

encontrado os alelos TNFa2 e TNFa6, que estão associados com o aumento de produção do TNF α na doença.

Assim, devido à importância que o TNF desempenha na resposta imune inflamatória em doenças, os STRs do “cluster” do TNF, seriam candidatos à investigação na psoríase, identificando dessa forma, associações de susceptibilidade ou proteção.

1.2.3.3- Polimorfismo na região promotora com doenças

A região gênica que codifica o TNF contém diversos pontos de mutação, como mostra a Figura 6, sendo que os dois polimorfismos bialélicos nessa região do gene TNF poderiam ser relevantes para a produção do TNF. Na população caucasiana a mutação mais comum situam-se na posição -238 e -308, onde ocorre uma substituição de G-A (D'ALFONSO e RICHIARDI, 1994). O alelo -308*A foi originalmente associado com lupus eritematoso sistêmico (LES) em caucasianos e esse alelo é parte de um haplótipo para o LES, HLA-DR3, B8, A1 (WILSON et al., 1994; ROOD et al., 2000). Não foi encontrada associação com o alelo -238. O alelo -308 não foi encontrado associado com a artrite reumatóide (AR), mas foi associado com os alelos dos STRs TNF (WILSON et al., 1995b). Em estudos para várias formas de psoríase foi demonstrada uma associação significativa com os alelos TNF-238 e TNF-308 (ARIAS et al., 1997; HÖHLER et al., 1997).

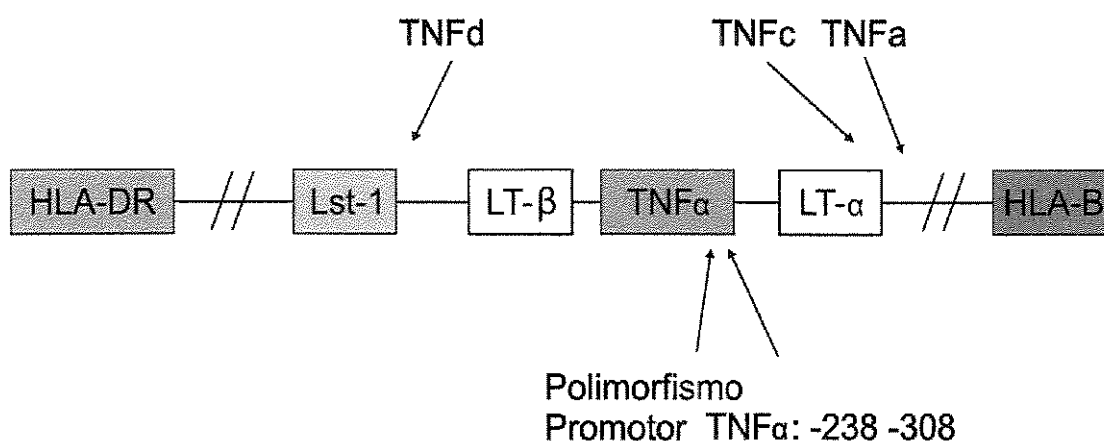


Figura 6- Localização dos dois polimorfismos da região promotora no loco TNF no CPH de classe III, no cromossomo 6 (HÖHLER et al., 2002).

2- OBJETIVOS

A prevalência da psoríase é significativa na população brasileira e a patogênese da doença permanece desconhecida, mas fatores genéticos são sugeridos na etiologia da doença. Nas regiões do CPH encontram-se genes responsáveis pela produção de importantes mediadores da resposta imune. Assim, como estes mediadores estão envolvidos na patogênese da psoríase, há um particular interesse na associação entre esta doença e as características genéticas dos indivíduos por ela afetados.

Dessa forma, nesse trabalho os objetivos foram:

- Identificar o polimorfismo dos alelos HLA de classe I e microssatélites do TNF, no sangue periférico de pacientes com psoríase vulgar e no grupo-controle de indivíduos sadios utilizando-se as técnicas moleculares DNA/PCR/SSP e DNA/PCR/STR;
- Avaliar a distribuição dos alelos e haplótipos dos genes HLA-A, -B, -C (classe I) e dos cinco microssatélites, TNFa, b, c, d, e, no grupo total de pacientes com psoríase vulgar, nos grupos de psoríase tipo I e tipo II e no grupo-controle de indivíduos sadios;
- Determinar associações que estejam envolvidas com os fatores genéticos desencadeantes à psoríase em pacientes brasileiros.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- População de estudo

Pacientes e controles

Um total de 92 pacientes com psoríase vulgar foi diagnosticado a partir de critérios clínicos (SAMPAIO e RIVITTI, 2000) com idade entre 10 a 80 anos (média=43,3), 41 pacientes homens (44,6%) e de 51 pacientes mulheres (55,4%), como mostra a Tabela 2. Os pacientes, nessa pesquisa, eram acompanhados no ambulatório de Dermatologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, entre 2002 a 2003, todos do Estado de São Paulo e estudados para os genes HLA de classe I. Setenta pacientes tinham psoríase tipo I e 22 pacientes psoríase tipo II, selecionados ao acaso para o início da doença.

Dos 92 pacientes, 70 foram estudados para os cinco marcadores microssatélites no loco TNF, sendo 48 pacientes psoríase tipo I e 22 com psoríase tipo II, também selecionados ao acaso para o início da doença.

Os critérios clínicos para o diagnóstico da psoríase foram:

- a) presença de uma ou mais lesões em forma de placas eritemato-escamosas de tamanhos variados e bem definidos,
- b) localização das lesões (membros, particularmente joelhos e cotovelos, couro cabeludo e região sacra, mucosas genitais e mucosas dos lábios),
- c) sinais da vela e do orvalho sangrante positivos à curetagem metódica de Brocq.

De cada paciente avaliado ou de seu responsável foi obtido o consentimento pós-informado, e o protocolo de estudo foi devidamente analisado e aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

O grupo-controle constitui-se de 160 indivíduos sadios, com a idade entre 18 a 53 anos, provenientes do Banco de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas-Hemocentro, da mesma região geográfica dos pacientes, geneticamente não relacionados e estudados para o genes HLA de classe I.

Desse grupo-controle de indivíduos sadios, foram estudados 71 indivíduos para os cinco marcadores microssatélites no loco TNF.

A população estudada, nessa pesquisa, é constituída por imigrantes caucasianos europeus, ameríndios brasileiros e negros. Essa distribuição, com essa variedade étnica, reflete na mistura de genes HLA, presentes na população, podendo variar significativamente sobre determinada base regional. Dessa forma, pacientes com psoríase e o grupo-controle de indivíduos sadios foram selecionados na mesma região geográfica.

Tabela 2- Características dos 92 pacientes com psoríase vulgar estudados.

Pacientes	Idade	Início da doença	Sexo	Pacientes	Idade	Início da doença	Sexo
1. MSG	41	26	F	47. LMT	62	58	F
2. ABL	63	55	F	48. ORS	43	39	M
3. AO	80	06	F	49. MPJS	51	11	F
4. NJF	50	30	M	50. APS	74	70	M
5. RMV	45	10	F	51. JJ	60	48	M
6. BAS	49	35	M	52. NS	65	57	M
7. EHL	17	09	M	53. LS	73	14	M
8. MAA	33	29	M	54. SRE	28	26	F
9. JVM	69	57	M	55. ECSR	25	23	M
10. MAOM	43	36	F	56. SECM	43	28	F
11. GHA	59	42	M	57. JS	39	36	M
12. FA	62	47	M	58. GGS	71	60	F
13. AB	54	30	M	59. JRL	53	23	M
14. LRD	59	19	F	60. NAP	67	41	F
15. ERC	85	74	M	61. MBA	45	42	F
16. RV	37	17	M	62. JDG	46	07	F
17. NP	65	45	F	63. MAL	55	18	F
18. JLBC	40	19	M	64. VA	35	07	F
19. SNN	60	58	F	65. CAS	40	10	M
20. MLPF	57	47	F	66. SG	42	07	F
21. MFSP	38	25	F	67. CMLM	19	13	F
22. ECOC	21	14	F	68. TC	25	13	F
23. WR	61	50	M	69. RT	17	16	M
24. LBS	40	34	F	70. AP	12	07	M

Pacientes	Idade	Início da doença	Sexo	Pacientes	Idade	Início da doença	Sexo
25. EFMJ	41	33	M	71. JPS	61	15	M
26. VLM	49	39	F	72. ACP	15	03	F
27. JPO	68	50	M	73. MB	14	13	F
28. PAB	56	40	M	74. LBP	15	11	M
29. JP	62	28	M	75. ACC	35	13	F
30. SG	65	57	M	76. AAS	20	10	F
31. LCL	56	28	M	77. EML	22	20	M
32. RT	57	28	M	78. JAC	10	03	F
33. CASP	47	31	F	79. EM	27	06	M
34. VBS	39	25	M	80. ICC	12	01	F
35. OAS	72	3	F	81. DSS	09	06	F
36. JD	58	35	F	82. AFM	16	12	F
37. AM	66	50	M	83. SGS	28	19	F
38. LS	18	03	F	84. SSO	23	17	F
39. LC	55	40	F	85. TF	19	18	F
40. EM	63	52	M	86. RCSS	18	10	F
41. PR	61	51	M	87. MLMS	38	15	F
42. TC	56	40	F	88. APL	08	05	F
43. LGO	51	44	M	89. BCVS	09	02	F
44. MDRO	44	40	F	90. CAC	17	04	F
45. AS	41	39	M	91. JJS	37	17	M
46. ALS	70	40	M	92. KSB	15	15	F

3.2- Tipagem dos genes HLA de classe I

As amostras do sangue periférico foram obtidas dos 92 pacientes com psoríase e 160 indivíduos do grupo-controle de indivíduos saudáveis.

Caracterização do ensaio

A tipagem dos genes HLA-A, -B, -C foi realizada no grupo de pacientes e no grupo-controle de indivíduos saudáveis. A extração e purificação do DNA foram realizadas através do método “Salting Out”, introduzido por MILLER et al., 1988, a partir de células do sangue periférico. O DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase, com um

conjunto de “primers” sequência específica, segundo a metodologia desenvolvida por OLERUP e ZETTERQUIST (1992), utilizando-se microplacas com 96 poços contendo os “primers” nível I – genérico, adquiridas comercialmente da One Lambda, INC-CA EUA.

3.2.1- Extração e Purificação do DNA

Foram coletados 10 mL de sangue venoso do paciente e grupo-controle de indivíduos sadios em tubos de 5 mL contendo EDTA como anticoagulante. O sangue total foi transferido para um tubo cônico de polipropileno estéril de 50mL. Foram adicionados 40 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos, tampão de lise I gelado. Em seguida a solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada durante 5 minutos a 2400 xg (3200 rpm) a + 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o precipitado ressuspensionado em 4,5 mL do tampão de lise de glóbulos brancos, tampão de lise II, agitado vigorosamente por 10 segundos a temperatura ambiente. Para a extração de proteínas foram adicionados 2 mL de NACL 6M e agitado vigorosamente durante 15 segundos à temperatura ambiente. Após uma segunda centrifugação a 1500 xg (2600 rpm) por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL evitando o precipitado, e foi adicionado 7mL de isopropanol absoluto, homogeneizado gentilmente para a precipitação e ressuspensão do DNA. O DNA precipitado foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e lavado três vezes em 3mL de álcool etanol a 70%, por um minuto, à temperatura ambiente e redissolvido em 300 a 500µL de água deionizada estéril. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro, em 260nm e 280nm (UV) e o grau de pureza do DNA foi calculado pela razão entre absorbância obtida em 260nm e 280nm (A260:A280). Esta razão foi considerada adequada quando permaneceu entre 1,6 a 2,0. Finalmente a concentração do DNA foi ajustada para 100ng/µL, com água deionizada estéril. Posteriormente foi realizada a amplificação do DNA e a amostra concentrada foi guardada em freezer a -20°C.

3.2.2- Amplificação do gene HLA-A, -B, -C utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR) com “primers” sequência específica – PCR/SSP

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método sensível para separar grandes quantidades de genes HLA específicos para tipagem HLA. Utilizando esse método pode-se gerar milhões de cópias de um gene específico (HURLEY, 1997).

A reação de amplificação foi realizada em microplacas, com 96 poços contendo os “primers” já padronizados para classe I. Os demais reagentes da reação de amplificação foram misturados em um tubo (mix) constituído de bases nitrogenadas, $MgCl_2$, corante vermelho de cresol, 5,6 μL da enzima Taq polimerase (5U/ μL). Inicialmente, foram retirados 9 μL da solução (mix) e adicionados na escavação do controle negativo, previamente preparada com 1 μL de água deionizada estéril. A seguir foi adicionado ao restante da solução (mix) o DNA genômico na concentração final de 100ng/mL. E, por fim, foram colocados 10 μL em cada um dos poços da placa, exceto no controle negativo. Pelo método PCR/SSP, foram realizadas as identificações, em nível genérico, dos alelos HLA classe I, através de amplificações para 21 especificidades HLA-A, 36 especificidades HLA-B e 14 especificidades HLA-C.

Para a amplificação do DNA, a microplaca foi colocada em um termociclador (MJ - PTC-100 / Watertown, MA - USA), com 30 ciclos de aproximadamente 1 hora e 20 minutos, com as temperaturas indicadas a seguir: 94°C por 2 minutos, para a desnaturação; 59°C por 1 minuto, para o anelamento; 94°C por 10 segundos, para a desnaturação; 59°C por 1 minuto, para o anelamento; 8 vezes 94°C por 10 segundos, para a desnaturação e 8 vezes 59°C por 1 minuto, para o anelamento; 94°C por 10 segundos, para a desnaturação; 55°C por 50 segundos, para o anelamento; 72°C por 30 segundos, para a extensão; 19 vezes 94°C por 10 segundos, 19 vezes 72°C por 30 segundos e 4°C indefinidamente.

No final dos ciclos, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 2% com adição do corante brometo de etídio a 0,5%.

3.2.3- Análise do DNA Amplificado

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose. A preparação do gel foi realizada utilizando-se agarose a 2% em tampão Tris-Borato, dissolvida em alta temperatura, entre 90°C e 95°C, por dois a três minutos, com posterior adição de brometo de etídio a 0,5%, misturada e despejada na placa com pentes, para a formação dos sulcos, onde, posteriormente, foram aplicadas as amostras. O tempo de polimerização foi de aproximadamente 40 minutos, à temperatura ambiente. Após a retirada dos pentes, o gel foi colocado na cuba de eletroforese, com o nível da solução tampão (Tris-Borato-1X) de 2 a 3 mm acima da superfície do gel. Foram então aplicados os produtos da amplificação e o controle negativo. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 220V. Após esse período, o gel foi colocado em um transluminador UV (312nm) e fotografado para documentação e interpretação.

3.2.4- Fotodocumentação e interpretação dos resultados

A interpretação foi baseada na presença ou ausência de amplificação do próprio alelo ou grupo-específico; em cada uma das misturas de iniciadores específicos. A presença de um par de iniciadores não alélicos, constituiu-se em controle interno positivo de amplificação. O produto da amplificação desse “primer” é de 750 pares de bases (pb), visualizados quando a amplificação grupo específico não ocorrer. A presença da amplificação no grupo-específico foi visualizada no gel pela formação de um produto de cerca de 125 a 250 pares de bases, e foram caracterizadas como reações positivas para o alelo ou grupos de alelos analisados. No poço referente ao controle-negativo nenhum desses fragmentos foi observado.

3.2.5- Associação e detecção dos alelos HLA

Após a realização da fotodocumentação, os resultados foram inseridos em uma planilha, fornecida pela One Lambda-Inc-Ca-EUA, onde apresentam as mesmas especificidades encontradas na placa com os “primers”. Uma vez inseridos os resultados na planilha, foram também inseridos em um programa de computador, da One Lambda-Inc-Ca-EUA, que auxilia na interpretação, permitindo revelar com exatidão os alelos dos pacientes e do grupo-controle de indivíduos sadios em estudo.

3.3- Tipagem dos microssatélites TNF

As amostras do DNA genômico, previamente extraído através do método “Salting out”, foram obtidas dos 70 pacientes com psoríase e 71 do grupo-controle de indivíduos sadios.

Caracterização do ensaio

A tipagem dos 5 (cinco) STRs para o loco TNF, segundo a metodologia desenvolvida por UDALOVA et al., 1993, foram realizados nos pacientes e no grupo-controle de indivíduos sadios e classificados, de acordo com o número de alelos de cada STR. Os alelos de cada marcador foram nomeados baseados no comprimento do fragmento amplificado. Após a amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (seqüências de todos os iniciadores estão descritas na Tabela 3), a visualização dos alelos foi possível através da separação eletroforética em géis desnaturantes, em condições específicas para cada loco e corados, segundo SANGUINETTI et al., 1994.

Tabela 3- Relação dos marcadores polimórficos de DNA utilizados.

Sistema	Localização Cromossômica	Seqüências iniciadoras
TNFa	6p21.3	5'-GCC TCT AGA TTT CAT CCA GCC ACA-3' 5'-CCT CTC TCC CCT GCA ACA CAC A-3'
TNFB	6p21.3	5'-GCA CTC CAG CCT AGG CCA CAG A-3' 5'-GTG TGT GTT GCA GGG GAG AGA G-3'
TNFC	6p21.3	5'-GGT TTC TCT GAC TGC ATC TTG TCC-3' 5'-TCA TGG GGA GAA CCT GCA GAG AA -3'
TNFd	6p21.3	5'-AGA TCC TTC CCT GTG AGT TCT GCT -3' 5'-CAT AGT GGG ACT CTG TCT CCA AAG -3'
TNFe	6p21.3	5'-GTG CCT GGT TCT GGA GCC TCT C -3' 5'-TGA GAC AGA GGA TAG GAG AGA CAG -3'

UDALOVA, 1993

3.3.1- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação foi realizada utilizando-se 2µL de cada amostra de DNA genômico. Para preparar a mistura de reação da PCR, utilizou-se eppendorfs identificados de acordo com a amostra utilizada e preparados em banho de gelo. A mistura de reação foi constituída por:

TNF a, b, c

- 15,65µL de água deionizada autoclavada
- 2,5µL de tampão de reação (10X)
- 0,5µL de Mgcl₂ (50mM)
- 0,25µL de solução de dNTP (20mM)
- 2,0µL de cada iniciador específico para cada STR (0,2µM)
- 0,10µL de Taq polimerase (5U/µl)

TNF d, e

- 14,90µL de água deionizada autoclavada
- 2,5µL de tampão de reação (10X)
- 1,25µL de Mgcl₂ (50mM)
- 0,25µL de solução de dNTP (20mM)
- 2,0µL de cada iniciador específico para cada STR (0,2µM)
- 0,10µL de Taq polimerase (5U/µl)

O volume de cada componente utilizado para preparar a mistura de reação da PCR, foi multiplicado pelo número de amostras a serem utilizadas.

Após, aplicou-se 21µL da mistura de reação em cada eppendorf contendo as amostras de DNA genômico. Em todas as análises foi utilizado como controle negativo um tubo contendo água no lugar do DNA.

Os programas para execução da PCR foram compostos por três etapas principais, que se repetiram por vários ciclos. A etapa de desnaturação foi responsável pela separação da dupla hélice do DNA, na temperatura de 91 a 95°C. Na etapa de pareamento ocorreu a hibridação do iniciador (“primer”) com o DNA molde, à temperatura de 53 a 65°C. Por fim, a etapa de extensão foi responsável pela síntese de um novo filamento de DNA.

Para a amplificação dos cinco STRs TNF foi necessário um termociclador (“Applied Biosystems”). Os locos TNFa e TNFb foram submetidos a duas PCRs, como descrito por UDALOVA et al., 1993, com pequenas modificações nos programas de amplificação, descritas a seguir:

STR-TNFa, TNFb (1º PCR)

STR-TNFc

Etapa 1 (1 ciclo): 94°C por 5 minutos;

Etapa 2 (32 ciclos): 94°C por 1 minuto; 61°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto;

Etapa 3 (1 ciclo): 72°C por 10 minutos;

4°C indefinidamente.

STR-TNF α , TNF β (2° PCR)

STR-TNF δ , TNF ϵ

Etapa 1 (1 ciclo): 94°C por 5 minutos;

Etapa 2 (28 ciclos): 94°C por 50 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos;

Etapa 3 (1 ciclo): 72°C por 10 minutos;

4°C indefinidamente.

3.3.2- Análise do produto amplificado

Para visualização dos produtos amplificados, as amostras foram aplicadas em géis verticais desnaturantes, de poliacrilamida com uréia (12%), submetidos a condições eletroforéticas específicas para cada loco (Tabela 3) e corados de acordo com o método de SANGUINETTI et al., 1994, como descritos a seguir.

Separação Eletroforética dos Produtos Amplificados

A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em condições desnaturantes, com o gel na concentração de 12% com os seguintes componentes:

- 4,0 ml de água deionizada;
- 8,0 ml de acrilamida e bis-acrilamida (29:1);
- 9,6 g de uréia;
- 2,0 ml de tampão TBE 10X;
- 15 μ l de TEMED;
- 300 μ l de solução saturada de persulfato de potássio.

Após a preparação, o gel foi imediatamente aplicado a um cassete de tamanho determinado, previamente montado. Este cassete é composto por duas placas de vidro colocadas sobre um suporte, separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos de aço. Logo após a aplicação do gel entre as placas, colocou-se um pente de teflon na borda superior que tem, por função, formar os sulcos onde, posteriormente, serão aplicadas as amostras. Após a polimerização do gel, o pente foi retirado e esse montado em uma cuba de eletroforese vertical, contendo tampão TBE (o mesmo utilizado na preparação do gel, diluído 10X) em ambos pólos.

Para a realização da corrida eletroforética dos STRs, 3µl da amostra a ser analisada foi misturada a 7µl de tampão de amostra contendo formamida 75%. A mistura foi aquecida a 94°C por 10 minutos e, imediatamente, colocada em banho de gelo e aplicadas nos géis, assim como os devidos padrões de migração que permitiram identificar os alelos. Esses padrões foram obtidos por meio de uma escada alélica feita com amostras aleatórias, tipificadas previamente e comparadas entre si, objetivando-se a determinação de bandas maiores e menores. A leitura prévia foi confirmada em novos géis, nos quais as amostras, que em princípio pareciam conter o mesmo alelo, foram aplicadas lado a lado. Então, uma amostra de cada alelo foi escolhida para definir a escada alélica de cada sistema tornando, assim, precisa a tipificação. O gel foi submetido a 20mA, pelo tempo determinado para cada marcador. As condições específicas de cada loco são descritas na Tabela 4.

Coloração com Nitrato de Prata

Após ser retirado da placa, o gel foi colocado em 100ml de solução fixadora (álcool etílico, ácido acético, água deionizada) por 5 minutos e foram adicionados 2ml de nitrato de prata a 10% com agitação por 5 minutos.

Para revelação a solução fixadora com prata foi descartada e o gel foi lavado uma vez em água deionizada. Após desprezar a água foram colocados 100ml de solução reveladora (NaOH e água deionizada) com 1ml de formaldeído sobre o gel que foi agitado até o aparecimento das bandas.

Registro dos resultados

Após as leituras das bandas reveladas nos géis (foram consideradas as bandas dos padrões previamente conhecidos), estes foram secos para serem arquivados. A secagem foi feita colocando-se o gel entre duas folhas de celofane embebidas em água sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente por 2 a 3 dias.

Tabela 4- Condições específicas para eletroforese de cada loco polimórfico estudado.

Loco	Gel	Tamanho	Corrente	Tempo
TNFa	12% desnaturante	12cm	20mA	2:40 horas
TNFB	12% desnaturante	18cm	20mA	5:00 horas
TNFC	12% desnaturante	12cm	20MA	3:30 horas
TNFD	12% desnaturante	18cm	20mA	4:00 horas
TNFe	12% desnaturante	10cm	20mA	2:00 horas

3.4- Análises Estatísticas

A análise dos resultados entre as comparações das frequências alélicas do grupo de pacientes e do grupo-controle de indivíduos sadios, foi efetuada pelo teste exato de Fisher (SVEJGAARD e RYDER, 1994).

A significância estatística foi dada quando $p < 0,05$. O valor de p foi multiplicado pelo número de alelos estudados e comparações realizadas, $pc = p$ corrigido (SVEJGAARD e RYDER, 1994; LECHLER e WARRENS, 2000).

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com emprego do programa GENEPOP (RAYMOND e ROUSSET, 1995b) versão 2.0 para Windows.

Estimativa das frequências alélicas e genotípicas

Os sistemas analisados apresentam alelos codominantes que permitem inferir os genótipos a partir dos respectivos fenótipos. As frequências alélicas e genotípicas para cada loco em cada grupo de amostras foram estimadas por contagem direta.

Métodos computacionais para reconstrução de haplótipos

Para se determinar as constituições dos dois haplótipos de cada indivíduo, dois métodos computacionais distintos foram empregados: algoritmo EM (EXCOFFIER e SLATKIN, 1995), implementado pelo programa HTR (ZAYKIN et al., 2002), e método PHASE (STEPHENS e DONNELLY, 2001). Estimativas de diversidade haplotípica intra-populacional e os testes exatos para diferenciação entre os grupos amostrais baseado nas frequências haplotípicas foram realizados utilizando-se o programa Arlequin (SCHNEIDER e ROESSLI, 2000). Para se verificar a existência de haplótipos em frequências significativamente distintas entre grupos de amostras, as frequências de cada haplótipo foram comparadas entre pares de grupos (PsV I vs. PsV II; PsV I vs. Controle; PsV II vs. Controle; PsV total vs. Controle), pela aplicação do teste exato de Fisher (GraphPad in Stat, versão 3.0), indicado principalmente para os casos em que uma proporção inferior a cinco seja esperada em uma ou mais classes.

4- RESULTADOS

4.1- Tipagem dos alelos HLA-A, -B, -C

Os alelos HLA-A, -B, -C dos pacientes com psoríase e do grupo-controle de indivíduos sadios foram tipificados através da amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase, com “primers” sequência específica (PCR/SSP), resolução intermediária, de acordo com o método de OLLERUP e ZETTERQUIST, 1992.

A Figura 7 ilustra a análise dos produtos das reações e a interpretação da tipagem por PCR/SSP em gel de agarose. A presença ou ausência da amplificação grupo específico visualizada no gel foi analisada através de planilhas específicas para os 96 poços contendo “primers” nível I genérico (One Lambda, INC-CA EUA).

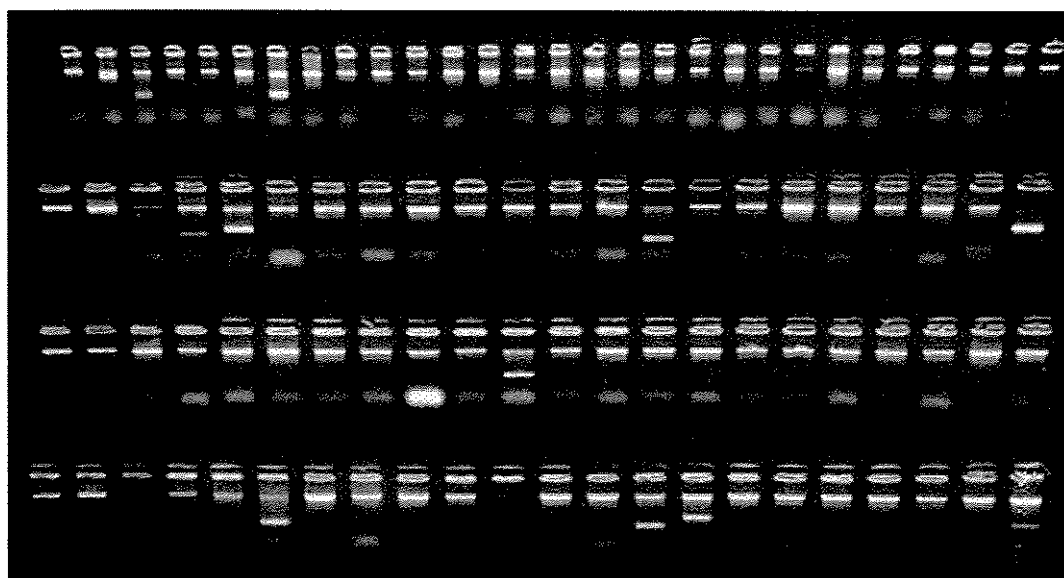


Figura 7- Ilustra uma tipagem HLA de classe I de um indivíduo do estudo.

A análise em gel de agarose mostra os produtos das reações de amplificação por PCR/SSP. O controle-positivo de amplificação foi visualizado quando a amplificação grupo específico não ocorreu e, no poço referente ao controle-negativo, nenhum fragmento foi encontrado. A interpretação foi baseada na presença ou ausência de amplificação do alelo ou grupo específico.

A Tabela 5, a seguir, mostra os resultados obtidos na tipagem HLA-A, -B, -C nos 92 pacientes com psoríase vulgar. Na Tabela 6, encontram-se os resultados da tipagem HLA-A, -B, -C dos 160 indivíduos sadios do grupo-controle. As distribuições das frequências observadas nos alelos HLA de classe I em pacientes e no grupo-controle de indivíduos sadios estão na Tabela 7. Os alelos mais frequentes em ambos os grupos foram: HLA-A*01 (6,5% e 9,4%), HLA-A*02 (22,8% e 25,9%), HLA-A*03 (7,6% e 7,8%), HLA-A*24 (8,6% e 9,7%), HLA-B*07 (4,9% e 8,1%), HLA-B*15 (7,1% e 10,3%), HLA-B*35 (8,7% e 8,7%), HLA-Cw*04 (13,0% e 14,4%), HLA-Cw*07 (14,1% e 16,9%).

Tabela 5- Distribuição dos alelos HLA-A, -B, -C no grupo de pacientes com psoríase vulgar.

Pacientes	HLA Classe I		
	Alelo A	Alelo B	Alelo C
1. MSG	*01	*14, *57	*08, *06
2. ABL	*24, *30	*57, *56	*01, *06
3. AO	*24, *30	*13, *58	*06
4. NFJ	*02, *33	*14, *51	*08, *16
5. RMV	*02, *03	*18, *57	*07, *06
6. BAS	*02, *23	*37, *57	*02, *07
7. EHL	*01, *23	*07, *49	*07
8. MAA	*02	*15, *51	*16, *01
9. JVM	*02	*18, *35	*07, *04
10. MAOM	*02	*07, *35	*04
11. GHA	*01, *02	*27, *49	*02
12. FA	*02	*14	*08
3. AB	*02	*13	*06, *04
14. LRD		*39, *50	*12, *06
15. ERC	*68	*39	*03, *12
16. RV	*02, *03	*18, *57	*07, *06
17. NP		*15, *50	*01, *06
18. JLBC	*02	*08, *38	*12
19. SNN	*03	*07, *41	*07, *17
20. MLPF	*32	*53, *78	*04, *05
21. MFSP	*02	*39, *57	*12, *06
22. ECOC	*24	*14, *38	*02, *12
23. WR	*32	*13, *51	*06

Pacientes	HLA classe I		
	Alelo A	Alelo B	Alelo C
47. LMT	*03	*13, *15	*06, *08
48. ORS	*30	*13, *57	*18, *06
49. MPJS	*24, *23	*45, *27	*06, *12
50. APS		*39, *47	*12
51. JJ	*02	*07, *15	*07
52. NS	*02, *24	*52, *44	*12, *05
53. LS	*30	*53, *57	*04, *18
54. SER	*30	*58, *15	*06
55. ECSR	*02, *32	*44, *57	*12, *06
56. SECM	*02, *23	*18	*06, *07
57. JS	*01, *03	*37, *15	*06, *07
58. GGS	*02, *26	*35	*04
59. JRL	*02	*08, *50	*06
60. NAP	*01, *02	*07, *08	*07
61. MBA	*01, *02	*13, *35	*04
62. JDG	*02, *24	*44, *57	*12, *06
63. MAL	*02	*57, *44	*06, *05
64. VA	*24, *26	*50, *55	*06, *03
65. CAS	*26, *32	*37, *52	*06, *12
66. SG	*30, *11	*41, *35	*04, *17
67. CMLM	*02, *66	*41, *40	*03, *07
68. TC	*26, *30	*13, *38	*12, *06
69. RT	*02, *66	*58, *39	*07, *06

Pacientes	HLA Classe I		
	Alelo A	Alelo B	Alelo C
24. LBS	*02, *68	*35, *40	*04, *03
25. EFMJ	*01	*07, *08	*07
26. VLM	*01	*07, *08	*07
27. JPO	*24	*58, *35	*07, *04
28. PAB	*01, *30	*08, *13	*07, *06
29. JP	*29	*39, *27	*12, *01
30. SG	*02, *03	*51, *35	*01, *04
31. LCL	*02	*49, *15	*06, *03
32. RT		*57, *73	*06, *15
33. CASP	*11, *33	*55, *81	*03, *18
34. VBS	*68	*15, *40	*03
35. OAS	*01, *24	*38, *27	*06, *16
36. JD	*02	*57, *18	*06
37. AM	*24, *30	*42, *13	*17, *06
38. LS	*11, *29	*14, *35	*08, *04
39. LC	*68, *03	*15, *18	*05, *03
40. EM	*02	*51	*12, *14
41. PR	*01	*08, *35	*07, *04
42. TC	*03	*35, *15	*04, *03
43. LGO	*02, *31	*18, *39	*04, *08
44. MDRO	*33	*44, *49	*02, *07
45. AS	*01, *24	*57, *35	*01, *18
46. ALS	*02	*57, *15	*06, *04

Pacientes	HLA Classe I		
	Alelo A	Alelo B	Alelo C
70. AP	*24	*39, *35	*04, *12
71. JPS	*24, *68	*15, *39	*12, *07
72. ACP	*24, *68	*15, *38	*07, *12
73. MB	*02	*08, *35	*07, *04
74. LBP	*03, *30	*18, *51	*14, *05
75. ACC	*36, *02	*53	*04
76. AAS	*02	*52, *58	*12, *06
77. EML	*33	*37, *27	*06, *02
78. JAC	*03	*39, *58	*12, *06
79. EM	*26, *03	*07, *39	*07, *12
80. ICC	*03	*58, *27	*07, *02
81. DSS	*02, *32	*35, *39	*04, *12
82. AFM	*30, *68	*14, *35	*08, *04
83. SGS	*02, *03	*07, *44	*07, *04
84. SSO	*02, *24	*14, *47	*04
85. TF	*02	*51, *13	*15, *06
86. RCSS	*02	*35, *51	*04, *14
87. MLMS	*30	*13, *53	*06, *04
88. APL	*31	*49, *50	*07, *16
89. BCVS	*24, *03	*52, *13	*15, *06
90. CAC	*02, *26	*55, *57	*03, *06
91. JJS	*02	*27, *50	*01, *06
92. KSB	*02, *26	*51, *37	*06, *12

Tabela 6- Distribuição dos alelos HLA-A, -B, -C no grupo-controle de indivíduos sadios.

Controle	HLA Classe I			Controle	HLA classe I		
	Alelo A	Alelo B	Alelo C		Alelo A	Alelo B	Alelo C
1. SEM	*02	*49, *15	*03	81. MAF	*02, *31	*15, *18	*03, *07
2. JARM	*03, *26	*39, *41	*12, *17	82. HHCP	*01, *32	*08, *40	*07, *03
3. CRCV	*03, *32	*52, *14	*12, *08	83. CRP	*33, *74	*35, *08	*08, *07
4. MJS	*03, *32	*40, *35	*04	84. MHCP	*02, *31	*52, *39	*15, *07
5. JFF	*01, *32	*27, *37	*06	85. CRPJ	*01, *29	*07	*07, *02
6. AAMM	*01, *11	*07, *51	*01	86. WWC	*11, *34	*51	*15
7. MDCV	*24, *33	*07, *39	*15	87. MECG	*03, *02	*15, *51	*15, *02
8. MMN	*02	*35	*04, *12	88. MACCG	*02, *11	*44, *51	*07
9. MS	*02	*51	*01, *04	89. CJG	*02, *26	*15, *55	*03
10. CAB	*01, *26	*07, *08	*07	90. EWC	*24	*35, *38	*04, *12
11. MNAS	*01, *33	*08, *14	*07, *08	91. CTC	*02, *68	*51, *50	*07, *15
12. RFD	*01, *24	*57	*06, *15	92. ANS	*11, *24	*35	*04
13. JAS	*02, *03	*44, *45	*05, *06	93. NPC	*01, *66	*08	*07, *03
14. MFS	*02	*44, *58	*16	94. LLP	*02		*06, *14
15. MAM	*03, *68	*51, *14	*15, *08	95. JCA	*23	*51	*04, *14
16. ALL	*02, *68	*44	*05	96. MB	*11	*35, *52	*04, *16
17. AJR	*02, *03	*27, *48	*02, *04	97. RBS	*01, *33	*14, *51	*08, *15
18. SCO	*02, *24	*51	*03, *16	98. FBS	*01, *02	*08, *44	*07, *02
19. FOC	*02, *23	*15, *44	*05, *14	99. ICC	*33, *68	*14, *53	
20. CSR	*01, *24	*07, *45	*06	100. NBS	*02, *30	*42, *14	*01, *08
21. CBB	*02, *03	*58, *15	*06, *03	101. MC	*03, *30	*07, *27	*07, *02
22. OMS	*26	*07, *15	*03	102. RCB	*68, *29	*18, *44	*16
23. ARS	*24, *11	*44	*02, *04	103. ISR	*01, *02	*08	*07
24. BA	*32, *68	*07, *40	*02, *15	104. JRT	*02, *03	*15, *44	*03
25. ALS	*03, *30	*13, *07	*06	105. JMS	*02, *24	*07, *15	*07, *03
26. CASS	*02, *68	*18, *49	*05	106. SEM	*02, *29	*15	*04, *01
27. DAJ	*01, *26	*38, *35	*06	107. SEC	*02, *11	*44, *51	*04, *07
28. OPA	*02, *68	*35, *45	*04, *06	108. JMF	*26, *24	*35	*04
29. JAF	*29	*14, *49	*08	109. GSM	*02, *68	*27, *44	*02, *05
30. RF	*02, *03	*14, *51	*08	110. FHC	*02, *32		*12, *14
31. FFT	*32, *36	*44, *49	*05	111. LILS	*02, *01	*18, *07	*12, *07
32. LMB	*02, *03	*35, *08	*04	112. CS	*24, *02	*18, *35	*08, *04
33. SAR	*02	*51, *52	*15	113. GV	*03, *33	*07, *14	*07, *08
34. WCS	*01, *11	*27, *08	*01	114. CB	*31, *68	*14, *40	*03, *08
35. CSC	*02, *24	*35, *51	*04, *15	115. EGAM	*29, *30	*45, *14	*06, *08
36. BJT	*02, *26	*51, *57	*01, *06	116. MCD	*02	*07, *44	*08, *07
37. ALSJ	*02	*35, *44	*04	117. LPM	*02, *03	*15	*01, *03
38. MAC	*23	*38, *47	*07	118. RM	*02, *26	*51, *38	*12, *16
39. RSA	*68	*51, *53	*15, *04	119. DS	*02, *26	*08	*07
40. MPS	*25, *02	*44, *14	*05, *08	120. FCS	*02, *11	*07	*04, *12
41. SPS	*30, *02	*45, *15	*16, *08	121. VTNC	*03, *23	*58, *07	*07, *08
42. RPS	*02	*14, *15	*08	122. CPGB	*24, *26	*44, *07	*05, *12

Controle	HLA Classe I			Controle	HLA classe I		
	Alelo A	Alelo B	Alelo C		Alelo A	Alelo B	Alelo C
43. RPS	*03, *23	*55, *14	*03, *04	123. SN	*11, *24	*07, *44	*07, *04
44. BFS	*03, *24	*52	*02, *14	124. LSN	*24, *68	*18, *15	*07
45. ACB	*11, *31	*38, *51		125. BTC	*02, *68	*44, *57	*05, *18
46. CRM	*01	*38, *44	*12, *16	126. FDE	*02	*35, *08	*04, *05
47. CBC	*01	*47	*04, *12	127. JS	*01, *03	*07, *08	*07
48. SJO	*24	*35, *45	*04, *16	128. CC	*01, *08	*18, *08	*02, *07
49. MM	*02, *24	*18, *41	*17	129. MFK	*11, *68	*58, *35	*07, *04
50. AC	*02, *32	*15, *50	*04, *06	130. ACV	*02, *31		*07, *02
51. ASB	*02	*07, *18	*07, *05	131. LAR	*29, *68	*44, *42	*16, *17
52. MRM	*02, *29	*67, *15	*07	132. ACG	*02	*08	*07, *03
53. AWR	*29, *32	*39, *44	*12, *16	133. AM	*01, *31	*37, *39	*06, *16
54. SSA	*02, *32	*40, *44	*03	134. DM	*02, *01	*15, *07	*04, *03
55. CROM	*03, *24	*51, *44	*05, *15	135. SLS	*30, *33	*15, *14	*08, *02
56. JCT	*01, *02	*15, *14	*03, *08	136. LFS	*11, *30	*42, *44	*07, *17
57. EM	*36, *24	*47, *58	*04, *07	137. YS	*30, *02	*35, *42	*17, *04
58. RMS	*02, *24	*35, *14	*04, *08	138. TH	*33, *11	*14, *15	*08, *14
59. AVS	*02, *30	*51, *42	*14, *17	139. ALT	*01, *24	*07	*07, *15
60. SJS	*02, *33	*15, *14	*03, *08	140. PPBT	*02, *68	*07, *15	*07, *03
61. ACS	*02, *24	*08, *27	*07, *15	141. ABN	*02, *03	*49, *51	*07, *04
62. MZ	*02, *68	*07, *51	*04, *01	142. ILR	*01, *23	*52, *82	*08, *16
63. ICB	*02, *24	*57, *78	*06, *14	143. MIN	*03, *24	*15, *35	*07, *15
64. CTA	*02	*15	*04, *03	144. HPMIB	*02, *24	*15, *81	*03, *04
65. JRT	*01, *25	*08, *35	*07, *04	145. VEV	*02, *74	*52, *57	*07, *17
66. MEMT	*01, *24	*35, *58	*12, *07	146. CRA	*01, *03	*18, *58	*05, *06
67. THMT	*24	*08, *35	*07, *03	147. RGT	*24, *23	*35, *41	*08, *04
68. AEMT	*02, *03	*35, *07	*04, *07	148. BMM	*30, *02	*18, *44	*05
69. MAP	*02	*48, *44	*04, *05	149. RTN	*02, *24	*39, *40	*07, *03
70. ACP	*02	*15, *44	*03, *05	150. LB	*02, *34	*51, *57	*16, *07
71. BCP	*31, *34	*44, *39	*07, *04	151. DLMP	*24, *33	*08	*07, *04
72. IB	*30	*42	*17	152. JJBS	*03, *30	*50, *15	*07
73. MSGB	*11, *32	*35, *15	*04, *03	153. LCA	*02	*44, *40	*14, *03
74. JRB	*01, *02	*08, *39	*07	154. RGG	*02, *30	*07, *49	*07, *17
75. EIB	*02	*44, *40	*03, *08	155. SLG	*02, *68	*15, *39	*08, *16
76. SAGB	*02, *31		*07, *15	156. SDE	*33, *36	*15, *53	*04, *03
77. LCB	*01, *32	*58, *49	*07	157. LPT	*01, *68	*15, *53	*14, *04
78. MCB	*26	*39, *38	*12	158. RMP	*34, *02	*44, *58	*04, *06
79. PCB	*02, *29	*44, *39	*01, *08	159. EMX	*02, *74	*07, *15	*07, *14
80. GCB	*31, *34	*44, *35	*07, *04	160. TLBT	*02, *24	*35, *15	*04, *12

Tabela 7- Distribuição das frequências (%) dos alelos HLA-A, -B, -C nos pacientes com psoríase vulgar e no grupo-controle de indivíduos sadios.

Psoríase			Controle			Psoríase			Controle		
Alelo HLA-A*	n=92	n=160	Alelo HLA-B*	n=92	n=160	Alelo HLA-Cw*	n=92	n=160	Alelo HLA-Cw*	n=92	n=160
	Fa %	Fa %		Fa %	Fa %		Fa %	Fa %		Fa %	Fa %
*01	(12) 6,5	(30) 9,4	*07	(09) 4,9	(26) 8,1	*01	(07) 3,8	(09) 2,8			
*02	(42) 22,8	(83) 25,9	*08	(08) 4,3	(19) 5,9	*02	(06) 3,2	(12) 3,7			
*03	(14) 7,6	(25) 7,8	*13	(12) 6,5	(01) 0,3	*03	(10) 5,4	(27) 8,4			
*11	(03) 1,6	(15) 4,7	*14	(07) 3,8	(18) 5,6	*04	(24) 13	(46) 14,4			
*23	(04) 2,1	(07) 2,1	*15	(13) 7,1	(33) 10,3	*05	(05) 2,7	(16) 5			
*24	(16) 8,6	(31) 9,7	*18	(08) 4,3	(12) 3,7	*06	(40) 21,7	(16) 5			
*25	(00) 0,0	(02) 0,6	*22	(00) 0,0	(00) 0,0	*07	(26) 14,1	(54) 16,9			
*26	(07) 3,8	(11) 3,4	*27	(07) 3,8	(06) 1,8	*08	(07) 3,8	(27) 8,4			
*29	(02) 1,1	(09) 2,8	*35	(16) 8,7	(28) 8,7	*12	(23) 12,5	(15) 4,7			
*30	(12) 6,5	(13) 4,1	*37	(05) 2,7	(02) 0,6	*14	(03) 1,6	(11) 3,4			
*31	(02) 1,1	(09) 2,8	*38	(05) 2,7	(07) 2,1	*15	(04) 2,1	(17) 5,3			
*32	(05) 2,7	(12) 3,7	*39	(12) 6,5	(11) 3,4	*16	(03) 1,6	(14) 4,4			
*33	(04) 2,1	(11) 3,4	*40	(03) 1,6	(08) 2,5	*17	(03) 1,6	(09) 2,8			
*34	(00) 0,0	(05) 1,5	*41	(03) 1,6	(03) 0,9	*18	(04) 2,1	(01) 0,3			
*36	(01) 0,5	(03) 0,9	*42	(01) 0,5	(06) 1,8						
*66	(02) 1,1	(01) 0,3	*44	(06) 3,2	(33) 10,3						
*68	(07) 3,8	(19) 5,9	*45	(01) 0,5	(06) 1,8						
*74	(00) 0,0	(03) 0,9	*47	(02) 1,1	(03) 0,9						
			*48	(00) 0,0	(02) 0,6						
			*49	(05) 2,7	(07) 2,1						
			*50	(06) 3,2	(03) 0,9						
			*51	(09) 4,9	(23) 7,1						
			*52	(04) 2,1	(07) 2,1						
			*53	(04) 2,1	(03) 0,9						
			*55	(03) 1,6	(02) 0,6						
			*56	(01) 0,5	(00) 0,0						
			*57	(16) 8,7	(06) 1,8						
			*58	(07) 3,8	(09) 2,8						
			*67	(00) 0,0	(01) 0,3						
			*73	(01) 0,5	(00) 0,0						
			*78	(00) 0,0	(01) 0,3						
			*81	(01) 0,5	(01) 0,3						
			*82	(00) 0,0	(01) 0,3						

Fa (%)=(n/2N) x 100

n=soma de um alelo específico

N= número total de indivíduos

4.2- Avaliação das frequências de alelos HLA de classe I entre os pacientes com psoríase e o grupo-controle de indivíduos sadios

A primeira coluna da Tabela 8, 9 e 10 representam as especificidades desses alelos determinados por PCR/SSP e as demais colunas mostram as frequências dos alelos (valores expressos em porcentagem) dos pacientes com psoríase vulgar e grupo-controle de indivíduos sadios, o valor de p , o valor do pc (p corrigido), a razão de risco (Odds Ratio - OR) e IC 95% OR (intervalo de 95% de confiança para a OR).

Tabela 8- Frequências (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I nos pacientes com psoríase vulgar e grupo-controle de indivíduos sadios.

Alelos	HLA classe I		p	pc	OR	IC 95% OR
	PsV	Controle				
HLA	n=92	n=160				
HLA-B*13	(12) 6,5%	(01) 0,31%	< 0,0001	0,003	22,25	2,80 - 172,7
HLA-B*44	(06) 3,2%	(33) 10,3%	0,005	ns	0,3	0,12 - 0,71
HLA-B*57	(16) 8,7%	(06) 1,9%	0,0005	0,02	4,9	1,90 - 12,9
HLA-Cw*06	(40) 21,7%	(16) 5,0%	< 0,0001	0,001	5,3	2,86 - 9,7
HLA-Cw*12	(23) 12,5%	(15) 4,7%	0,002	0,03	2,9	1,47 - 5,7

ns = não significante

p = valor de p

pc = p corrigido

OR =razão de risco (Odds Ratio)

IC 95% OR = intervalo de 95% de confiança para a OR

Tabela 9- Frequências (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I nos pacientes com psoríase tipo I e grupo-controle de indivíduos sadios.

Alelos	HLA classe I		p	pc	OR	IC 95% OR
	PsV I	Controle				
HLA	n=70	n=160				
HLA-B*13	(08) 5,7%	(01) 0,31%	0,0004	0,01	19,35	2,40 - 156,2
HLA-B*44	(15) 10,7%	(33) 10,3%	0,0150	ns	0,3	0,12 - 0,84
HLA-B*57	(05) 3,5%	(06) 1,9%	<0,0001	0,003	6,3	2,38 - 16,55
HLA-Cw*06	(35) 25%	(16) 5,0%	< 0,0001	0,001	6,3	3,87 - 11,91
HLA-Cw*12	(18) 12,9%	(15) 4,7%	0,003	0,04	3,1	1,47 - 6,14

PsV I = grupo de pacientes psoríase tipo I

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

ns = não significante

p = valor de p

pc = p corrigido

OR =razão de risco (Odds Ratio)

IC 95% OR = intervalo de 95% de confiança para a OR

Tabela 10- Frequências (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I nos pacientes com psoríase tipo II e no grupo-controle de indivíduos sadios.

Alelos	HLA classe I		p	pc	OR	IC 95% OR
	PsV II	Controle				
HLA	n=22	n=160				
HLA-B*13	(04) 9,1%	(01) 0,31%	0,0009	0,005	31,9	3,40 - 292,6
HLA-B*44	(01) 2,3%	(33) 10,3%	ns			
HLA-B*57	(01) 2,3%	(06) 1,9%	ns			
HLA-Cw*06	(05) 11,4%	(16) 5,0%	ns			
HLA-Cw*12	(04) 9,1%	(15) 4,7%	ns			

PsV II = grupo de pacientes psoríase tipo II

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

ns = não significante

p = valor de p

pc = p corrigido

OR =razão de risco (Odds Ratio)

IC 95% OR = intervalo de 95% de confiança para a OR

4.3-Tipagem dos microsatélites TNF

A sensibilidade da eletroforese em gel de poliacrilamida seguida de coloração com nitrato de prata permitiram a visualização bem definida dos alelos no cinco locos analisados. Os pacientes com psoríase e o grupo-controle de indivíduos sadios apresentaram 14 alelos para o loco TNFa, 07 alelos para o loco TNFb, 02 alelos para o loco TNFc, 06 alelos para o loco TNFd e 03 para o loco TNFe.

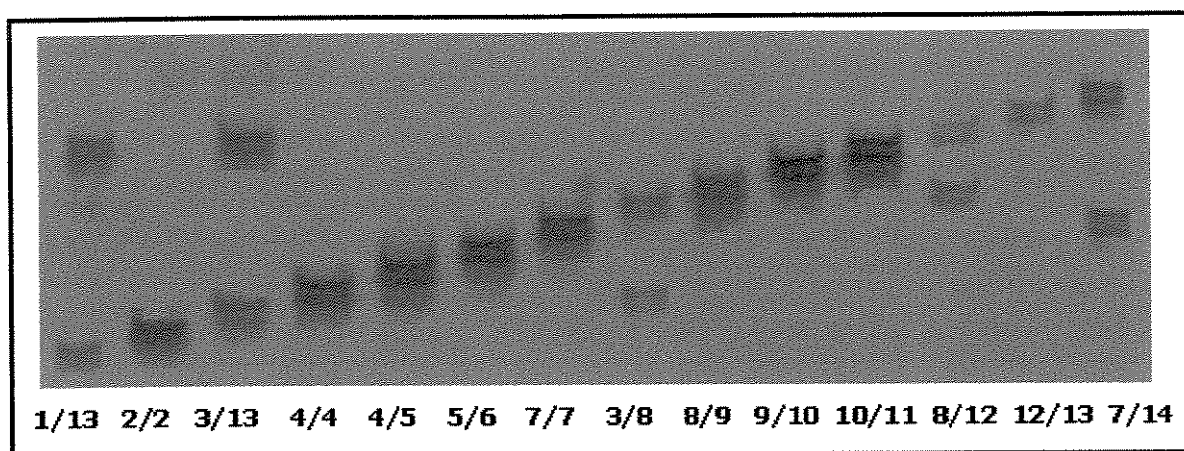


Figura 8- Gel de poliacrilamida 12% mostrando a mobilidade eletroforética dos alelos do loco TNFa, definindo padrões de leitura utilizados na análise dos alelos.

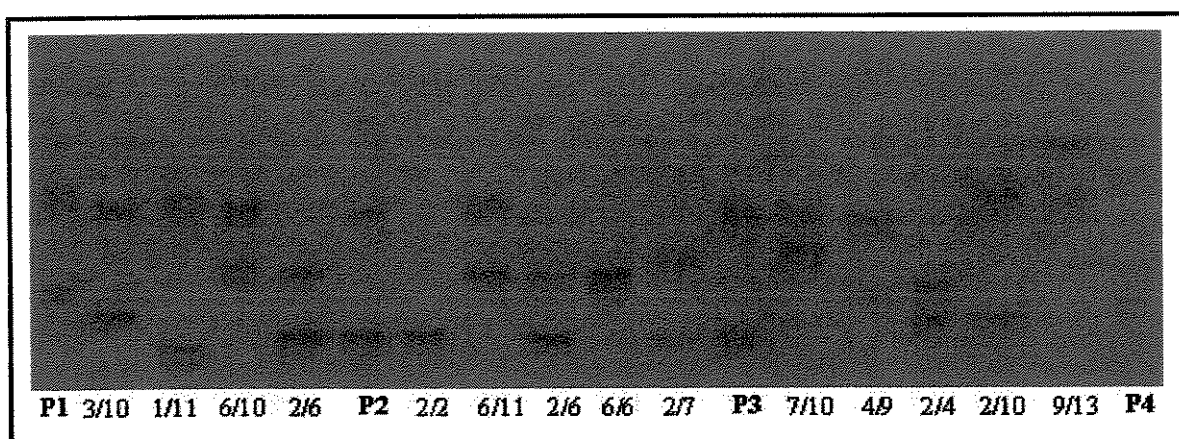


Figura 9- Ilustra a tipagem dos alelos do STR/TNF do loco TNFa de 06 indivíduos do estudo. Análise em gel de poliacrilamida 12%, dos produtos das reações de amplificação foi possível quando as amplificações foram comparadas aos padrões (P1,2,3,4) definidos para os alelos do loco, como ilustra a Figura 8.

4.4- Avaliação das frequências dos STRs TNF entre os pacientes com psoríase e o grupo-controle de indivíduos sadios

As Figuras 10, 11, 12, 13 e 14 mostram as distribuições dos alelos do TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe. Na Tabela 11 a primeira coluna representa os alelos nos cinco locos analisados. As demais colunas mostram as frequências dos alelos (valores expressos em porcentagem) determinados por PCR/STR dos pacientes com psoríase vulgar e grupo-controle de indivíduos sadios. Nas Tabelas 12, 13 e 14 a primeira coluna representa os alelos dos STRs TNF que apresentaram significância estatística e as demais colunas mostram as frequências dos alelos (valores expressos em porcentagem) nos pacientes e no grupo-controle de indivíduos sadios, o valor de p , o valor de pc (p corrigido), a razão de risco (Odds Ratio-OR) e o IC 95% OR (intervalo de 95% de confiança para a OR).

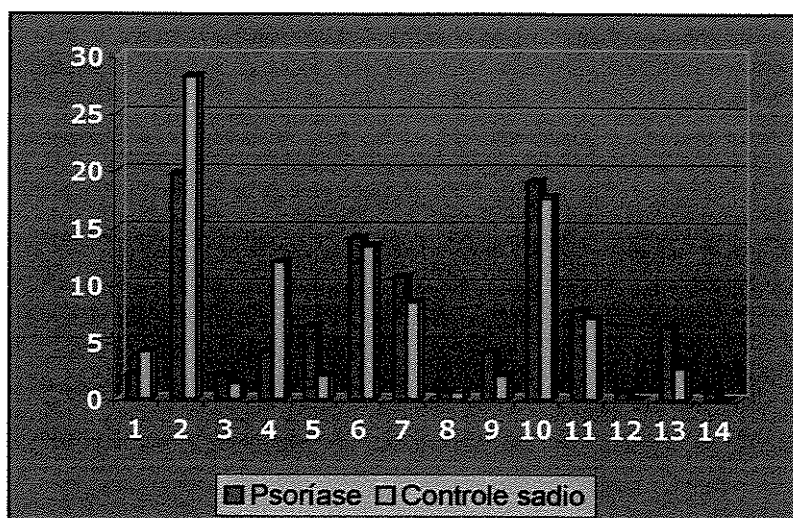


Figura 10- Frequência dos alelos TNFa em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.

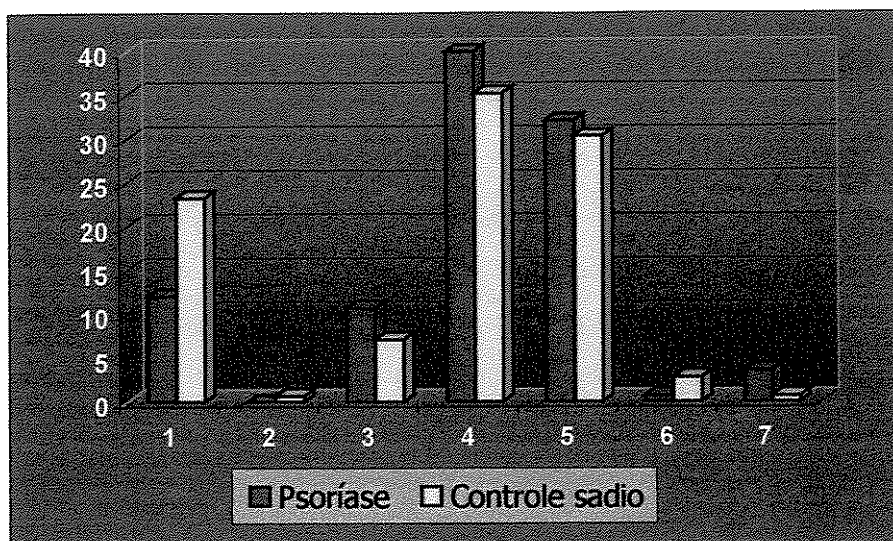


Figura 11- Frequência dos alelos TNF β em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos saudáveis.

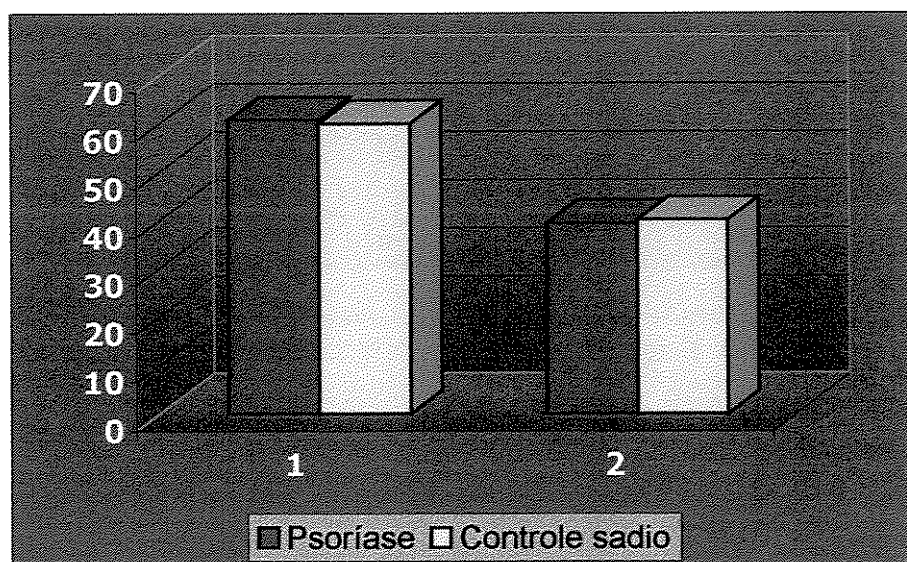


Figura 12- Frequência dos alelos TNF α em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos saudáveis.

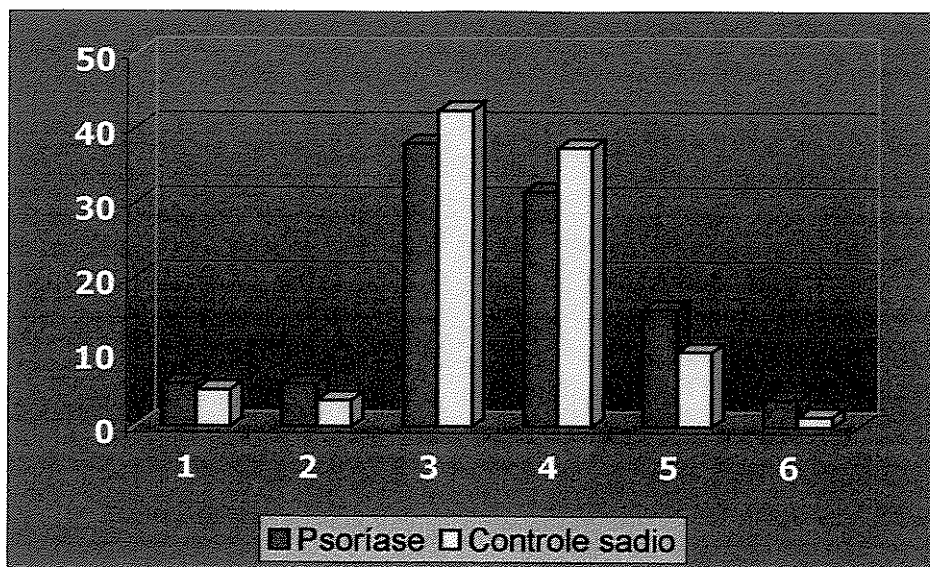


Figura 13- Frequência dos alelos TNF δ em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.

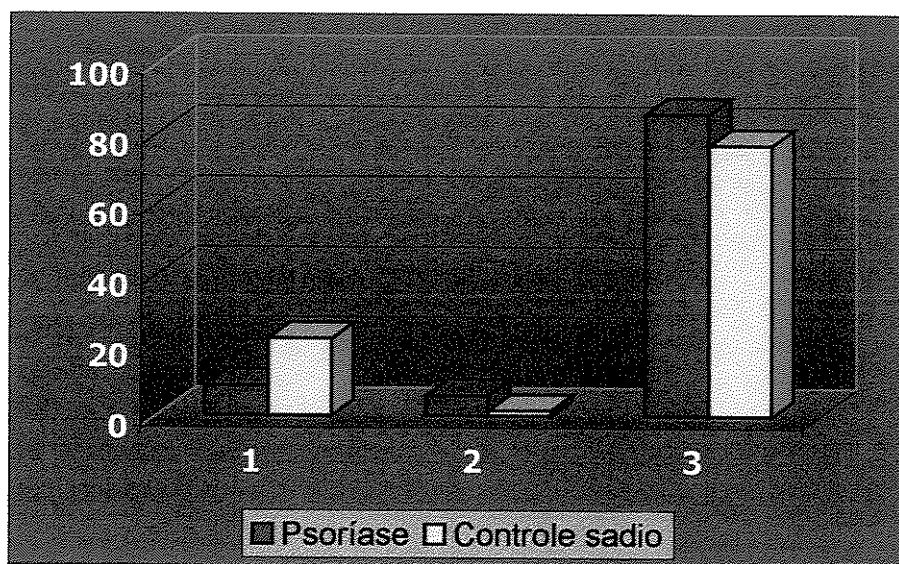


Figura 14- Frequência dos alelos TNF ϵ em pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.

Tabela 11- Distribuição das frequências (%) dos alelos STRs TNF nos pacientes com psoríase vulgar n=70 e grupo-controle de indivíduos sadios n=71.

Alelos	TNFa		TNFb		TNFc		TNFd		TNFe	
	PsV	Controle	PsV	Controle	PsV	Controle	PsV	Controle	PsV	Controle
1	(03) 0,02	(06) 0,04	(17) 0,12	(33) 0,23	(85) 0,61	(85) 0,60	(08) 0,06	(07) 0,05	(12) 0,09	(31) 0,22
2	(28) 0,20	(40) 0,28	(00) 0,00	(1) 0,007	(55) 0,39	(57) 0,40	(08) 0,06	(05) 0,03	(08) 0,06	(02) 0,01
3	(03) 0,02	(02) 0,01	(15) 0,10	(10) 0,07			(53) 0,38	(60) 0,42	(120) 0,86	(109) 0,77
4	(06) 0,04	(17) 0,12	(56) 0,40	(50) 0,35			(44) 0,31	(53) 0,38		
5	(09) 0,06	(03) 0,02	(45) 0,32	(43) 0,30			(22) 0,16	(14) 0,10		
6	(20) 0,14	(19) 0,13	(1) 0,007	(04) 0,03			(05) 0,03	(02) 0,01		
7	(15) 0,10	(12) 0,08	(05) 0,03	(1) 0,007						
8	(1) 0,007	(1) 0,007								
9	(06) 0,04	(03) 0,02								
10	(27) 0,19	(25) 0,17								
11	(11) 0,08	(10) 0,07								
12	(1) 0,007	(00) 0,00								
13	(09) 0,06	(04) 0,03								
14	(1) 0,007	(00) 0,00								

Fa (%)=(n/2N) x 100

n=soma de um alelo específico

N= número total de indivíduos

Tabela 12- Frequências (%) e significância estatística dos alelos STRs TNF nos pacientes com psoríase vulgar e grupo-controle de indivíduos sadios.

Microssatélites - TNF					
Alelos	PsV	Controle	p	OR	IC 95% OR
STR - TNF n=70		n=71			
TNFA4	(06) 4,3%	(17) 12,0%	0,03	0,33	0,12 - 0,86
TNFB1	(17) 12,1%	(33) 23,3%	0,02	0,45	0,24 - 0,86
TNFE1	(12) 8,6%	(31) 21,9%	0,002	0,33	0,16 - 0,68

PsV total = grupo total de pacientes com psoríase

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

ns = não significante

p = valor de p

OR =razão de risco (Odds Ratio)

IC 95% OR = intervalo de 95% de confiança para a OR

Tabela 13- Frequências (%) e significância estatística dos alelos STRs TNF nos pacientes com psoríase tipo I e grupo-controle de indivíduos sadios.

STR - TNF					
Alelos	PsV I	Controle	p	OR	IC 95% OR
STR - TNF n=48		n=71			
TNFA4	(03) 3,1%	(17) 12%	0,02	0,24	0,07 - 0,83
TNFB1	(12) 12,2%	(33) 23,3%	0,04	0,47	0,23 - 0,97
TNFE1	(08) 8,2%	(31) 21,9%	0,007	0,32	0,14 - 0,74

PsV I= grupo de pacientes com psoríase tipo I

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

ns = não significante

p = valor de p

OR =razão de risco (Odds Ratio)

IC 95% OR = intervalo de 95% de confiança para a OR

Tabela 14- Frequências (%) e significância estatística dos alelos STRs TNF nos pacientes psoríase tipo II e grupo-controle de indivíduos sadios.

Alelos	STR - TNF		p	OR	IC 95% OR
	PsV II	Controle			
STR - TNF	n=22	n=71			
TNFA4	(03) 7,1%	(17) 12%	ns		
TNFB1	(05) 12%	(33) 23,3%	ns		
TNFE1	(04) 9,5%	(31) 21,9%	ns		

PsV II= grupo total de pacientes com psoríase tipo II

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

ns = não significante

p = valor de p

OR =razão de risco (Odds Ratio)

IC 95% OR = intervalo de 95% de confiança para a OR

4.5- Análise dos haplótipos HLA-B, -C e STR TNF com a utilização de métodos computacionais

Os 163 indivíduos completamente tipados quanto aos locos HLA-B e HLA-C foram submetidos à reconstrução computacional haplotípica. Dessa forma, os haplótipos com alelos não identificados e o loco HLA-A por apresentar “hot spots” de recombinação na região que o separa dos demais marcadores foram excluídos. Desses 163 indivíduos, 153 (93,9%) tiveram suas constituições haplotípicas mais prováveis reconstruídas com probabilidade igual ou superior a 0,95 pelo algoritmo EM, enquanto que apenas 124 (76,1%) tiveram seus haplótipos definidos com tal probabilidade pelo método PHASE. Ao se comparar os resultados obtidos pelos dois métodos distintos, observou-se que, em apenas dois (1,2%) dos 163 indivíduos, as constituições haplotípicas resultantes como mais prováveis pelos dois métodos não foram as mesmas, isto é, o genótipo de um determinado

indivíduo, resultou em um par de haplótipos ao ser analisado pelo primeiro método, enquanto que outro par de haplótipos foi encontrado ao ser analisado pelo segundo método.

Dessa forma, foi adotado uma postura conservadora e esses dois indivíduos foram desconsiderados para as análises subseqüentes, permanecendo apenas os 161 indivíduos com a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos dois métodos, como mostra a Tabela 15 (anexo). A probabilidade média de reconstrução destes 322 haplótipos selecionados foi de 0,975.

Dos 141 indivíduos tipificados quanto aos cinco STR estudados (TNFa, TNFb, TNFc, TNFd e TNFe) e submetidos à reconstrução computacional, 128 (90,8%) obtiveram suas constituições haplotípicas mais prováveis reconstruídas com probabilidade igual ou superior a 0,95 pelo algoritmo EM, enquanto que apenas 95 (67,4%) tiveram seus haplótipos definidos com tal probabilidade pelo método PHASE. Ao se comparar os resultados obtidos pelos dois métodos distintos, observou-se que, em apenas 20 (14,2%) dos 141 indivíduos, as constituições haplotípicas resultantes como mais prováveis pelos dois métodos não foram as mesmas. Novamente foi adotado uma postura conservadora e apenas os 121 indivíduos com a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos dois métodos, como mostra a Tabela 16 (anexo) foram considerados para as análises subseqüentes. A probabilidade média de reconstrução destes 242 haplótipos selecionados foi de 0,957.

Diversidade genética intra-populacional

A diversidade haplotípica dentro de cada grupo de amostras foi muito elevada e semelhante entre os grupos amostrais, como mostra a Tabela 17 (anexo). A menor amplitude de variação foi observada nos locos HLA, variando de 0,9730 a 0,9785, enquanto que a maior amplitude de variação foi observada nos STR do TNF com os locos HLA, variando de 0,9420 a 1,0000.

Teste exato de diferenciação populacional

O teste exato para diferenciação entre os grupos amostrais baseado nas frequências haplotípicas revelou diferenças significativas nos haplótipos HLA-B, HLA-C, entre os grupos psoríase total e psoríase tipo I com o grupo-controle de indivíduos sadios como mostra a Tabela 18 (anexo). Esses achados constituem-se um forte indicativo de que

esta região cromossômica está diretamente associada à susceptibilidade ou proteção à psoríase, principalmente quando o início da doença é antes dos 40 anos.

Para identificar haplótipos com as frequências elevadas ou reduzidas nos grupos amostrais, foram criadas Tabelas de contingência 2 x 2 para cada haplótipo e aplicado o teste exato de Fisher, comparando a frequência de tais haplótipos entre o grupo dos pacientes com psoríase, psoríase tipo I e tipo II e o grupo-controle de indivíduos saudáveis. Os haplótipos com significância estatística (11 comparações significativas) foram apresentadas na Tabela 19. Observa-se que os haplótipos HLA-B*57 Cw*06, B*13 Cw*06 e B*39 Cw*12 correspondem a 21,81% e 2,16% dos haplótipos nos grupos, psoríase tipo I e grupo-controle de indivíduos saudáveis, respectivamente. A elevada diferença indica que esses haplótipos conferem susceptibilidade à psoríase, principalmente a psoríase tipo I, confirmando os achados do teste exato de diferenciação populacional como mostra a Tabela 19.

Tabela 19- Frequências absolutas e relativas dos haplótipos que apresentaram significância estatística entre o grupo total de pacientes com psoríase, psoríase tipo I, psoríase tipo II e grupo-controle de indivíduos sadios.

Haplótipo	Frequência		Frequência		P	Susceptibilidade ou Proteção
	Absoluta	Relativa(%)	absoluta	Relativa(%)		
	PsV I		PsV II			
TNF						-
a11 b4 c1 d3 e3	1	0,0122	6	0,1667	0,003	
TNF						-
a2 b5 c2 d4 e3	8	0,0976	0	0	0,049	
	PsV I		Controle			
HLA-B*57Cw*06	10	0,0909	2	0,0108	0,001	Susceptibilidade
HLA-B*13Cw*06	6	0,0545	0	0	0,002	Susceptibilidade
HLA-B*39Cw*12	8	0,0727	2	0,0108	0,007	Susceptibilidade
	PsV II		Controle			
TNF						
a11 b4 c1 d3 e3	6	0,1667	7	0,0565	0,044	Susceptibilidade
HLA-B*13Cw*06	2	0,0769	0	0	0,015	Susceptibilidade
	PsV Total		Controle			
TNF						
a2 b1 c2 d4 e1	10	0,0847	21	0,1694	0,037	Proteção
HLA-B*13Cw*06	8	0,0588	0	0	0,001	Susceptibilidade
HLA-B*57Cw*06	11	0,0809	2	0,0108	0,002	Susceptibilidade
HLA-B*39Cw*12	8	0,0588	2	0,0108	0,016	Susceptibilidade

PsV I = grupo de pacientes psoríase tipo I

PsV II = grupo de pacientes psoríase tipo II

PsV total = grupo total de pacientes com psoríase

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

P= valor de Fisher

Avaliação das frequências haplotípicas no HLA-B, -C e STR TNF

Embora nenhum haplótipo formado pelos sete marcadores tenha ocorrido com frequências significativamente distintas é importante ressaltar que, o haplótipo HLA-B*57 HLA-Cw*06 / TNFa2 b5 c2 d4 e3 foi encontrado nos pacientes com psoríase tipo I na frequência de 0,2500 enquanto que o grupo controle sadio a frequência foi de apenas 0,0500 como mostra a tabela 20 (anexo). Esse haplótipo foi sempre encontrado em heterozigose, isto é, em 7 indivíduos distintos. Estes 7 indivíduos são os únicos completamente tipados (sete polimorfismos) que apresentaram todos os alelos necessários para a obtenção do haplótipo mencionado. Dessa forma, considerando todos os pacientes com psoríase tipo I e os indivíduos do grupo controle sadio que possuem tipagem completa temos:

- 6 haplótipos HLA-B*57 Cw*06 / TNFa2 b5 c2 d4 e3 (psoríase tipo I)
- 1 haplótipos HLA-B*57 Cw*06 / TNFa2 b5 c2 d4 e3 (grupo-controle de indivíduos sadios)

Aplicando-se o teste exato de Fisher, encontrou-se um valor muito próximo ao nível de significância adotado, quando comparado a psoríase tipo I e o controle sadio ($p = 0,0506$). Assim, pode-se considerar que o haplótipo HLA-B*57 HLA-Cw*06 / TNFa2 b5 c2 d4 e3 também esteja relacionado à susceptibilidade na psoríase do tipo I, sendo necessário um maior tamanho amostral para total confiabilidade dessa hipótese.

5- DISCUSSÃO

A base genética da psoríase é complexa e seu papel varia entre pacientes e seus familiares (heterogeneidade genética) (BARKER, 2001). Estudos comparando resultados em diferentes grupos étnicos e tipos de psoríase, com acometimento de história familiar, poderiam elucidar se esses genes são específicos para a psoríase ou secundariamente ligados aos genes responsáveis pela doença (ZHANG et al., 2004).

A análise de associação e ligação tem mostrado que o CPH é o maior determinante genético relatado para susceptibilidade à psoríase, e que no CPH o HLA-Cw*06 é o alelo que apresenta a mais forte associação com a psoríase (MARTÍNEZ-BORRA et al., 2003). Dessa forma, o desequilíbrio de ligação do sistema HLA, junto aos eventos de recombinação, poderiam mudar os haplótipos no qual o HLA-Cw6 está presente e a associação desse alelo com HLA-B13 ou HLA-B57 poderia indicar que esses haplótipos estão igualmente envolvidos com a susceptibilidade à doença, ou que outro gene associado com a psoríase esteja provavelmente localizado próximo desses genes (ROITBERG-TAMBUR et al., 1995). No HLA-Cw6, foi constatada a substituição do aminoácido alanina pela tirosina na posição 73, na fenda de ligação com o antígeno da molécula HLA-C (HENSELER e CHRISTOPHERS, 1995). Essa observação sugere que o local de encaixe do antígeno de ligação na fenda da molécula HLA-C é importante para a apresentação do suposto antígeno associado à psoríase (IKÄHEIMO et al., 1994). Do ponto de vista imunológico, uma anormalidade da molécula de classe I, HLA-Cw6 pode resultar no seu reconhecimento para antígenos estranhos, envolvendo a restrição das moléculas de classe I para as células T-CD8. Alternativamente, ela pode conduzir as ligações preferenciais de antígenos heterólogos e antígenos autólogos, ou ambos, com o subsequente reconhecimento pelas células T-CD8 (GRIFFITHS et al., 1995). As células se expandindo passam a responder aos peptídeos autólogos, resultando em uma doença auto-imune (NICKOLOFF et al., 1995). Entretanto, as moléculas de MHC de classe I são expressas na membrana de quase todas as células nucleadas do corpo, exceto nas vilosidades trofoblásticas, nos neurônios do sistema nervoso central, no endotélio córneo, e na porção exócrina do pâncreas (LECHLER, 1994).

O fenômeno de restrição pelas moléculas de classe I para os queratinócitos e sinóvia sugere o envolvimento de peptídeos locais, antígenos ou superantígenos (VALDIMARSSON et al., 1995). Também, a ativação de células T com restrição CPH-classe I pode resultar em danos na expressão da célula CPH de classe I, como nos queratinócitos (VALDIMARSSON et al., 1986).

Estudos realizados com marcadores STR TNF investigaram a produção do TNF α e a patogênese de muitas doenças (NIIZEKI et al., 2001; WEISSENSTENER e LANHBURY, 1997; POCIOT et al., 1993). A produção do TNF α , potente citocina proinflamatória, com muitas atividades biológicas é regulada pelo loco do TNF, que tem muitos polimorfismos e envolvida nas doenças inflamatórias. (POCIOT et al., 1993; HASHIGUCCI et al., 2003). Os polimorfismos dos genes do TNF podem estar relacionados com a susceptibilidade ou gravidade a vários grupos de doenças. A pesquisa da extensão genômica tem estabelecido uma forte associação da psoríase com o CPH e em particular com o haplótipo ancestral 57.1 (JENISCH et al., 1999). O exato papel do CPH na patogênese da psoríase ainda não está claro. Foi demonstrado por KALUZA et al., 2000, que o alelo do TNF α promotor, TNF238.2, que é parte do haplótipo B57.1, é encontrado frequentemente aumentado em pacientes com psoríase e está associado com uma significativa diminuição da atividade transcripcional *in vitro*. Particular interesse tem sido focado sobre a mutação G-A para a posição -308. Porém, resultados conflitantes tem sido relatados. O aumento da atividade transcripcional para o alelo TNF308.2 (WILSON et al., 1997) e o aumento da produção do TNF α das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foi descrito com esse alelo (BOUMA et al., 1996). Entretanto, outros grupos sugerem que não há efeito significativo desse alelo sobre a produção do TNF (TURNER et al., 1995; KROEGER et al., 1997; KALUZA et al., 2000).

Os STRs, embora usualmente sejam considerados marcadores evolucionários neutros, têm sido associados recentemente a vários processos biológicos relacionados à expressão gênica. A atuação dessas seqüências repetitivas parece iniciar-se desde a organização da cromatina até a transcrição do RNA mensageiro. Para explicar a participação dos STRs, nas diversas etapas de processamento do DNA, foi proposto que essas seqüências possam alterar a estrutura do DNA, induzindo a formação de dobramentos

nessa molécula e originando, assim, estruturas complexas e incomuns. Essas, por sua vez, poderiam oferecer vantagens à transcrição gênica, ao formar sítios únicos de reconhecimento de proteínas envolvidas na regulação da transcrição (CATASTI et al., 1999). Tem sido proposto também que os STRs funcionem como pontos de recombinação, pois enzimas envolvidas nesse processo têm alta afinidade por essas sequências repetitivas, principalmente as dinucleotídicas (BIET et al., 1999). Além desses mecanismos, os STRs, dependendo de sua localização, podem ainda encontrar-se em desequilíbrio de ligação com outras regiões do genoma que atuam diretamente no controle da expressão gênica (ex: região promotora), assim, a relação entre os polimorfismos e algumas doenças pode ser devido à influência direta da variabilidade genética sobre a expressão gênica, ou ainda, devido ao desequilíbrio de ligação dos genes do TNF com outros genes do CPH. Nesse estudo, foram analisados os marcadores STR que estão envolvidos na produção do TNF e na patogênese, para assim, investigar os locos de susceptibilidade à psoríase, pois alelos de locos polimórficos que estão ligados fisicamente, ocupando pequena extensão cromossômica, formam haplótipos úteis para a inferência de histórias populacionais e para estudos de associação com doenças. Esse é o caso dos STR localizados no gene TNF, na região de classe III do cromossomo 6p (HAJEER e HUTCHINSON, 2001).

Foram determinadas as tipagens HLA de classe I e os cinco marcadores STR TNF α . A análise desses marcadores polimórficos, associados com ambas as formas da doença (tipo I e tipo II), permitiram sugerir o segmento associado com a susceptibilidade à psoríase, em pacientes brasileiros. A presença de “hot-spots” de recombinação na região de mais de 1.300Kb que separa o loco HLA-A dos demais marcadores (STENZEL et al., 2004) foi o motivo da exclusão de todas as análises de reconstrução haplotípica.

Baseado nos achados de HENSELER e CHRISTOPHERS (1985), que definiram na psoríase, embora clinicamente similar, dois distintos tipos ou formas, que diferem na idade de início, história familiar, antígenos HLA e evolução da doença. Dessa forma, a psoríase com início antes dos 40 anos (tipo I), está associada com antígenos HLA-Cw6, B13, B57, DR7, mas a psoríase com início após os 40 anos (tipo II), que ocorre esporadicamente, é caracterizada somente por uma fraca correlação com os antígenos HLA (KUNDAKÇI et al., 2002).

Nesse estudo, os alelos HLA-B*13, -B*57, Cw*06 e -Cw*12 mostraram frequências aumentadas e significantes no grupo total de pacientes com psoríase e nos pacientes com psoríase tipo I, quando comparados ao grupo-controle de indivíduos saudáveis. Essas associações de alelos HLA em pacientes com psoríase tipo I foram descritas também em outros estudos (HENSELER, 1997; KRAEMER et al., 2000; CHOONHAKARN et al., 2002; BIRAL et al., 2003). No entanto, o alelo HLA-B*44 mostrou a frequência diminuída, com significância estatística no grupo total de pacientes com psoríase e no grupo de psoríase tipo I. Esse achado foi descrito anteriormente e já sugeria ser um alelo de proteção à doença (BIRAL et al., 2003). No grupo de psoríase tipo II somente o alelo HLA-B*13 mostrou significância estatística quando comparado ao grupo-controle de indivíduos saudáveis. A ocorrência da doença, após os 40 anos, é em uma frequência muito menor, quando comparada ao início antes dos 40 anos e com fraca correlação com os antígenos HLA. Entretanto, é importante salientar que se trata de um tamanho amostral pequeno ($n=22$), sendo necessário estudar um número maior de indivíduos com a doença para os marcadores HLA de classe I e, assim, confirmar esse achado, não relatado em outras populações estudadas. O HLA-Cw*06 apresenta um forte aumento no risco para psoríase, em aproximadamente todas as populações e esse pronunciado aumento nas frequências, ocorre apesar das diferenças nos grupos étnicos. Nesse estudo, o HLA-Cw*06 foi associado em 43,4% dos pacientes com psoríase (43,4% pacientes com psoríase comparados com 10,0% nos controles, $p<0,0001$). Tem sido estabelecido que o HLA-Cw*06 demonstra forte desequilíbrio de ligação com B*13 e B*57. Os haplótipos com esses dois alelos e o HLA-Cw*06 são frequentemente presentes nos pacientes com psoríase. Estes resultados identificaram forte associação dos haplótipos HLA-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06 e o HLA-B*39 Cw*06 com o grupo total de pacientes com psoríase e no grupo daqueles com psoríase tipo I, mostrando susceptibilidade à doença. Dois haplótipos apresentaram significância estatística para a psoríase tipo II, TNFa11 b4 c1 d3 e1, HLA-B*13 Cw*06. Esses achados não foram relatados em outros estudos com a psoríase tipo II, salientando que se trata de um estudo em uma população brasileira constituída por várias etnias.

A análise dos cinco marcadores STR TNF, em pacientes com psoríase, determinou uma diminuição da frequência dos alelos TNFa4, b1, e1 e do haplótipo TNFa2 b1 c2 d4 e1 nos pacientes quando comparados ao grupo-controle de indivíduos saudáveis.

Observou-se que, na psoríase tipo I e nos pacientes do grupo total foram encontrados os mesmos alelos diminuídos, quando comparados ao grupo-controle de indivíduos sadios. Esses resultados sugerem que estes alelos e o haplótipo são fatores de proteção à doença. Na psoríase tipo II não foi encontrado alelo com significância estatística.

Este estudo sugere que o haplótipo estendido, TNFa2 / b5 / c2 / d4 / e3 / HLA-B*57 / Cw*06, está relacionado à susceptibilidade dos indivíduos em ter psoríase tipo I. Esse haplótipo possui alelos descritos como parte de um haplótipo ancestral (TNF238A / a2 / c2 / d4 / B*57 / Cw*06), entretanto a variante promotora, TNF238A é encontrada muito frequentemente nos pacientes com psoríase (HÖHLER et al., 2002) e associada com a redução da produção do TNF α (PBMC). Contudo a função desses STR com o HLA de classe I na psoríase ainda não está definida.

6- CONCLUSÕES

Devido ao extenso polimorfismo do CPH, a sequência e a presença dos genes variam muito entre os haplótipos. Considerando, nesse estudo duas formas distintas para a psoríase, que diferem na idade de início e nos genes do CPH, foi possível concluir que:

- Os alelos HLA classe I, HLA-B*13, B*57, Cw*06, Cw*12 e os haplótipos HLA-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06 e HLA-B*39 Cw*12 apresentaram frequências significantes, quando comparados ao grupo-controle de indivíduos sadios, sendo associados à psoríase no grupo total e na psoríase tipo I, possivelmente como um dos fatores de risco à doença.
- O alelo HLA-B*44 está associado à psoríase tipo I, como fator de proteção, já que esse alelo apresenta-se com a frequência diminuída quando comparado ao grupo-controle de indivíduos sadios.
- Os alelos TNFa4, TNFb1, TNFe1 e haplótipo TNFa2 b1 c2 d4 e1, estão associados com a psoríase no grupo total como fator de proteção. Porém apresentaram-se também significantes no grupo de pacientes com psoríase tipo I.
- Os haplótipos TNFa11 b4 c1 d3 e3, HLA-B*13 Cw*06 e o alelo HLA-B*13 estão associados à susceptibilidade à psoríase tipo II, sugerindo envolvimento genético em pacientes com o início tardio da doença.
- O haplótipo estendido TNFa2 b5 c2 d4 e3 HLA-B*57 Cw*06 foi encontrado com frequência aumentada nos pacientes com a psoríase tipo I, quando comparado ao grupo-controle de indivíduos sadios, com um valor significativo, assim relacionado à susceptibilidade.
- As associações observadas nos alelos e haplótipos do HLA de classe I e STR do TNF sugerem risco genético à doença, mas a continuidade dos estudos com aumento amostral será necessário para total confiabilidade desses resultados em pacientes brasileiros com psoríase vulgar.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and molecular immunology**. 5th ed. Philadelphia, Saunders Company, 2003.
- ABELE, D; DOBSON, R.; GRAHAM, J. Heredity and psoriasis. Study of a large family. **Arch Dermatol**, 88: 38-47, 1963.
- ARIAS, A.I.; GILES, B.; EIERMANN, T.H.; STERRY, W.; PANDEY, N.J. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in psoriasis. **Exp Clin Immunogenet**, 14: 118-122, 1997.
- BAADSGAARD, O.; GUPTA, A.K.; TAYLO, R.S.; ELLIS, C.N.; VOORHEES, J.J.; COOPER, K.D. Psoriatic epidermal cells demonstrate increase numbers and function of non-Langerhans antigen- presenting cells. **J Invest Dermatol**, 92: 190-5, 1989.
- BALENDRAN, N.; CLOUGH, R.L.; ARGUELLO, J.R. Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. **J Invest Dermatol**, 113: 322-8, 1999.
- BARBARA, J.A.; VAN OSTADE X, LOPEZ, A. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, bad and potentially very effective. **Immunol Cell Biol**, 74: 434-443, 1996.
- BARKER, J.N.W.N. The pathophysiology of psoriasis. **Lancet**, 338:227-30, 1991.
- BARKER, J.N. Genetic aspects of psoriasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, 26: 321-325, 2001.
- BIET, E.; SUN, J.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, 27:596-600, 1999.
- BIRAL, A.C.; CARDOSO, C.B.; MAGALHAES, R.F.; MAGNA L. A.; TANAKA, A. M., KRAEMER, M.H. Association of psoriasis with specific alleles of the HLA-B*57 CW*06; B*13 CW*06 haplotypes in Brazilian patients: in search of genetic susceptibility. **Hum Immunol**, 64(10 Suppl): S137, 2003.

- BJERKE, J.R.; KROUGH, H.K.; MATRE, R. Characterisation of mononuclear cell infiltrate in psoriasis lesions. **J Invest Dermatol**, 71: 340, 1978.
- BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. **Nature**, 329: 506-512, 1987a.
- BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. **Nature**, 329: 512-518, 1987b.
- BJORKMAN, P.J.; PARHAM, P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility molecules. **Annual Review of Biochemistry**, 59: 253-288, 1990.
- BODMER, W.F. HLA: What's in name? A commentary on HLA nomenclature development over the years. **Tissue Antigens**, 46: 293-296, 1997.
- BOS, J.D.; DE RIE, M. A. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. **Immunology Today**, 40: 40-5, 1999.
- BOUMA, G.; CRUSIUS, J.B.A.; OUDKERK POOL, M. et al. Secretion of TNF-alpha and LTα in relation to polymorphism in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. **Scand J Immunol**, 43: 456-463, 1996.
- BOWCOCK, A.M.; BARKER, J.N. Genetics of psoriasis: The potential impact on new therapies. **J Am Acad Dermatol**, 49:S51-6, 2003.
- BOWCOCK, A.M.; COOKSON, W.O.C.M. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. **Human Molecular Genetics**, vol 13, Review Issue I, 2004.
- BOYMAN, O.; HEFTI, P.H.; CONRAD, C.; NICKOLOFF, B.J.; SUTER, M.; NESTLE, F.O. Spontaneous development of psoriasis in new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-α. **J Exp Med**, 199(5): 731-736, 2004.

- BRAUNSTEIN, N.S.; GERMAIN, R.N. Allele-specific control of Ia molecule surface expression and conformation: implication for a general model of Ia structure-function relationships. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, 84: 2921-2925, 1987.
- BRENNER, W.; GSCHNAIT, F.; MAYR, W.R. HLA B13, B17, B37 and Cw6 in psoriasis vulgaris: association with the age of onset. **Arch Dermatol Res**, 262(3): 337-339, 1978.
- CAMPBELL, R.D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunol Today**, 14: 349-352, 1993.
- CATASTI, P.; CHEN, X.; MARIAPPAN, S.V.; BRADBURY, E.M.; GUPTA, G. DNA repeats in the human genome. **Genetica**, 106:15-36, 1999.
- CENTRO BRASILEIRO DE PSORÍASE-CBP. Disponível em: <http://www.centrobrasileirodepsoriase.med.br>. Acesso em: 09 set. 2004.
- CERIO, R.; GRIFFITHS, C.E.M.; COOPER, K.D.; NICKOLOFF, B.J.; HEADINGTON, J.T. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. **Br J Dermatol**, 121: 421-31, 1989.
- CHANG, J.C.C.; SMITH, L.R.; FRONING, K. CD8⁺ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V β 3 and/or V β 13.1 genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91: 9282-86, 1994.
- CHARLESWORTH, B., SNIEGOWSKI, P., AND STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, 371(6494):215-20, 1994.
- CHICZ, R.M.; URBAN, R.G.; LANE, W.S.; GORGA, J.C.; STERN, L.J.; VIGNALI, D.A. et al. Predominantly naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. **Nature**, 358: 764-768, 1992.
- CHOONHAKARN, C.; ROMPHRUK, A.; PUAPAIROJ, C.; JIRARATTANAPOCHAI, K.; ROMPHRUK, A.; LEELAYUWAT, C. Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais. **International Journal of Dermatology**, 41:6, 330-334, 2002.

CHRISTOPHERS, E.; KRUGER, G. Psoriasis. In: FITZPATRICK, T.B; EISEN A.Z.; WOLFF, K. **Dermatology in General Medicine**.3rd ed. New York (NY): McGraw, 1987. p.465.

CHRISTOPHERS, E.; HENSELER, T. Psoriasis types I and II as subtypes of nonpustular psoriasis. **Semin Dermatol**, 11: 261-6, 1992.

CHRISTOPHERS, E.; MROWIETZ, U. Psoriasis. In: Freedberg, I.M.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; AUSTEN, K.F.; GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S.I.; FITZPATRICK, T.B. (eds) **Dermatology in general medicine**. Vol.1. MacGraw-Hill, New York, pp 495-521, 1999.

CHRISTOPHERS, E. Psoriasis - epidemiology and clinical spectrum. **Clinical and Experimental Dermatology**,26: 314-20, 2001.

CRESSWELL, P. & GEIRER, S.S. Antisera to human B-lymphocyte membrane glycoproteins block stimulation in mixed lymphocyte culture. **Nature**, 257: 147-149, 1975.

D'ALFONSO, S.; RICHIARDI, P.M. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter. **Immunogenetics**, 39: 150-154, 1994.

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

DIB, C.; FAURÉ, S.; FIZAMES, C.; SAMSON, D.; DROUOT, N.; VIGNAL, A. et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. **Nature**, 380: 152-154, 1996.

DRAKE, C.G.; KOTZIN, B.L. - Superantigens: biology, immunology, and potential role in disease. **J Clin Immunol**, 12: 149- 62, 1992.

DU VIVIER. **Atlas de Dermatologia Clínica**, 2^a ed. Manole Ltda, 5.2, 1997.

ELDER, J.T.; NAIR, R.P.; GUO, S.W.; HENSELER, T.; CHRISTOPHERS, E.; VOORHEES, J.J. The genetics of psoriasis. **Arch Dermatol**,130: 216-224, 1994.

- EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Mol Biol Evol**, 12:921-927, 1995.
- FARBER, E.M; NALL, L.; WATSON, W. Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. **Arch Immunol Rev**, 109: 207-11, 1974.
- FERENCZI, K.; BURACK, L.; POPE, M.; KRUEGER, J.G. ; AUSTIN, L.M. CD69, HLA-DR and the IL-2R Identify Persistently Activated T cells in Psoriasis Vulgaris Lesional Skin: Blood and Skin Comparisons by Flow Cytometric. **Journal of Autoimmunity**, 14: 63-78, 2000.
- GAMBLE, J.R.; HARLAN, J.M.; KLEBANOOF, S.J.; VADAS, M.A. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 82: 8667-8671, 1985.
- GORER, P.A. Genetic and Antigenic basis of tumor transplantation. **J Pathol Bacteriol**, 44: 691-697, 1937.
- GOTTLIEB, A.B.; KRUEGER, J.G. Role of T - lymphocytes (in psoriasis pathogenesis): In Dubertret L (ed): **Psoriasis**. Brescia. ISED, p. 63-71, 1994.
- GRIFFITHS, T.W.; GRIFFITHS, C.E.M.; VOORHEES, J.J. - Immunopathogenesis and immunotherapy of psoriasis. **Dermatol Clin**, 13: 739-49, 1995.
- HAJEER, A.H.; WORTHINGTON, J.; SILMAN, A.J.; OLLIVER, W.E. Association of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms with HLA-DRB1*04-bearing haplotypes in rheumatoid arthritis patients. **Arthristis Rheum**, 39: 1109-1114, 1996.
- HAJEER, A.H.; WORTHINGTON, J.; DAVIES, E.J.; HILLARBY, M.C.; POULTON, K.; OLLIER, W.E. TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, 49: 222, 1997.
- HAJEER, A.H.; HUTCHINSON, I.V. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. **Microsc Res Tech**, 50(3): 216-28, 2000.

- HAJEER A.H, HUTCHINSON I.V. Influence of TNF-alpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. **Hum Immunol**, 62(11): 1191-9, 2001.
- HANCOCK, G.E.; KAPLAN, G.; COHN, Z.A. - Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. **J Exp Med**, 168: 1395-402, 1988.
- HASHIGUCCI, K.; NIIZEKI, H.; NARUSE T.; OTA, M.; INAMOTO, N.; NISHIKAWA, T.; INOKO H. A clinical feature associated with polymorphisms of the TNF region in Japanese patients with palmoplantar pustulosis. **Hum Immunol**, 64(5): 530-7, 2003.
- HEARNE, C. M.; GHOSH, S.; TODD, J. A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends Genet**, 8(8): 288-94, 1992.
- HENSELER, T.; CHRISTOPHERS, E. Psoriasis of early and late onset: characterization of psoriasis vulgaris. **J Am Acad Dermatol**, 13:450-6, 1985.
- HENSELER, T. & CHRISTOPHERS, E. Disease concomitance in psoriasis. **J Am Acad Dermatol**, 32: 982-986, 1995.
- HENSELER, T. Genetics of psoriasis. **Arch Dermatol Res**, 37:1-11, 1997.
- HÖHLER, T.; KRUGER, A.; SCHENEIDER, P.M.; SCHOPF, R.E.; KNOP, J.; RITTNER, C. et al. A TNF alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. **J Invest Dermatol**, 109: 562-565, 1997.
- HÖHLER, T.; GROSSMANN, B.; STRADMAN-BELLINGHAUSEN, B.; KALUZA, W.; REUSS, E.; VLAM, DE K. et al. Differential association of polymorphisms in the TNF α region with psoriatic arthritis but not psoriasis. **Ann Rheum Dis**, 61: 213-218, 2002.
- HURLEY, C.K. - Acquisition and use of DNA-based HLA typing data in bone marrow registries. **Tissue Antigens**, 49: 323-8, 1997.
- IKÄHEIMO, I.; SILVENNOINEN-KASSINEN, S.; KARVONEN, J.; TIILIKAINEN, A. Alanine at position 73 of HLA-C is associated with psoriasis vulgaris in Finland. **Br J Dermatol**, 131: 257-9, 1994.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; HUNT, S.; WALPORT, M. **Immunology**: The Immune System in Health and Disease. 3th (ed) Garland Publishing Inc. USA, 535p, 1997.

JENISCH, S.; HENSELER, T.; WESTPHAL, E. - HLA-DQ9 (DQB1*0303) increases susceptibility to type I psoriasis in multiplex families but only in the presence of HLA-CW6. **J Invest Dermatol**, 104: 629, 1995.

JENISCH, S.; WESTPHAL, E.; NAIR, R.P.; STUART, P.; VOORHEES, J.J.; CHRISTOPHERS, E. et al. Linkage disequilibrium analysis of familial psoriasis: identification of multiple disease-associated MHC haplotypes. **Tissue Antigens**, 53: 135-146, 1999.

JONGENEEL, C. V.; BRIANT, L.; UDALOVA, I. A.; SEVIN, A.; NEDOSPASOV, S. A., AND CAMBON-THOMSEN, A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes, **Proc Natl Acad Sci**, 88(21): 9717-21, 1991.

KALUZA, W.; GROSSMANN, S.; HUG, R.; SCHOPF, E.R.; GALLE, P.R.; MAERKER-HERMANN, E.; HOEHLER, T. Different Transcriptional activity and *in vitro* TNF α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238 A promoter polymorphism. **The Journal of Investigative Dermatology**, 114: 1180-1183, 2000.

KIRK, C.W.; DROOGAN, A.G.; HAWKINS, S.A.; McMILLAN, S.A.; NEVIN, N.C.; GRAHAM, C.A. Tumor necrosis factor microsatellites show association with multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, 147: 21-25, 1997.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. **N Engl J Med**, 343(10): 702-709, 2000.

KRAEMER, M.H.S.; UTHIDA-TANAKA, A.M.; OLIVEIRA, V.C.; BIRAL, A.C.; CARDOSO, C.B.; MAGALHÃES, R.F. et al. Early-onset of Psoriasis in Brazilian patients: Support for HLA-Class I and Class II Analysis. In: SIRISINHA, S.; CHAIYAROJ, S.C.; TAPCHASRI, P. (Ed.) 2nd Congress of the Federation of Immunological Society of Asia-Oceania. Bologna, Italy: Monduzzi Editore, International Procedures Division, vI; 69-73, 2000.

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

KUCHELHORN, U.; FRENTZEL, S.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; GROETTRUP, M.; KLOETZEL, P.M. Incorporation of major histocompatibility complex-encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon- γ . **European Journal of Immunology**, 25: 2605-2611, 1995.

KUNDAKÇI, N.; OSKAY, T.; ÖLMEZ, Ü.; TUTKAK, H.; GÜRGEY, E. Association of psoriasis vulgaris with HLA class I and class II antigens in the Turkish population, according to the age at onset. **The International Society of Dermatology**, 41: 345-348, 2002.

LANDER, E.S.; SCHORK, N.J. Genetic Dissection Of Complex Traits. **Science**, 265: 2037-2048, 1994.

LECHLER, R. Mechanisms of HLA and disease associations. In: Lecher, R.(editor) **HLA & disease** . London ,Academic Press, p. 83-91, 1994.

LECHLER, R.; WARRENS, A. Appendix: Statistical Considerations in Analysing HLA and Disease Associations. In: Lechler, R. & Warrens, A. (ed) **HLA in Health and Disease**. London ,Academic Press, p 129-37, 2000.

LEUNG, D.Y.M.; WALSH, P.; GIORNO, R.; NORRIS, D.A. - A potential role for super-antigens in the pathogenesis of psoriasis. **J Invest Dermatol**, 100: 225-8, 1993.

LEWIS, H.M.; BAKER, B.S.; BOKTH, S. Restricted T-cell receptor V β gene usage in the skin of patients with gutate and chronic plaque psoriasis. **Br J Dermatol**, 129: 514-20, 1993.

Li, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, N. MBE Advance Access published Society for Molecular Biology and Evolution, p. 2-44, 2004.

- LOVE, J.M.; KNIGHT, A.M.; McALEER, M.A.; TODD, J.A. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. **Nucl Acids Res**, 18: 4123-4130, 1990.
- MARTÍNEZ-BORRA, J.; GONZÁLEZ, S.; JUANES-SANTOS, J.; SÁNCHEZ DEL RIO, J.; ALONSO-TORRE, J.C.; VÁSQUEZ-LÓPEZ, A.; et al. Psoriasis vulgaris and psoriatic arthritics share a 100 kb susceptibility region telomeric to HLA-C. **Rheumatology**, 42: 1089-1092, 2003.
- MATTHIAS, C.; JAHNKE, V.; FRYER, A.; STRANGE, R.; OLLIER, W.; HAJEER, A. Influence of tumour necrosis factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head and neck cancer, **Acta Otolaryngol**, 118(2): 284-8, 1998.
- MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. - A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA for Human Nucleated Cells. **Nuclei Acids Res**, 16: 1215, 1988.
- MONACO, J.J. Major histocompatibility complex-linked transport proteins and antigen processing. **Immunological Research**, 11: 125-132, 1992.
- MORGANROTH, G.S.; SHAN, L.S.; WEINSTEIN, G.D.; VOORHEES, J.J.; COOPER, K.D. Proliferation cells in psoriatic dermis are comprised primarily of T cells, endothelial cells, and factor XIIIa⁺ perivascular dendritic cells. **J Invest Dermatol**, 96: 333-40, 1991.
- MOSSMAN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clones I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, 136: 2348-57, 1986.
- NAIR, R.P.; STUART, P.; HENSELER, T.; JENISCH, S.; CHIA, N.V.; WESTPHAL, E. et al. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. **Am J Hum Genet**, 66: 1833-44, 2000.
- NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M.; MARTIN, C.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIN, E.; AND ET AL. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, 235(4796): 1616-22, 1987.

- NEDOSPASOV, S. A.; UDALOVA, I. A.; KUPRASH, D. V.; AND TURETSKAYA, R. L. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/lymphotoxin alleles tagged by two closely linked microsatellites in the upstream region of the lymphotoxin (TNF-beta) gene. **J Immunol** 147(3): 1053-9, 1991.
- NEEFJES, J.J.; MOMBURG, F. Cell biology of antigen presentation. **Current Opinion in Immunology**, 5: 27-34, 1993.
- NICKOLOFF, B.J.; TURKA, L.A. MITRA, R.S. - Direct and indirect control of T- cell activation by keratinocytes. **J Invest Dermatol**, 105: 25-9, 1995.
- NIIZEKI, H.; NARUSE, T.; HECKER, K.H.; TAYLOR, J.R.; KURIMOTO, I.; SHIMIZU, T.; YAMASAKI, Y.; INOKO, H.; STREILEIN, J.W. Polymorphisms in the TNF genes are associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. **Tissue Antigens**, 58: 369, 2001.
- NIKAEIN, A.; FHILLPS, C.; GILBERT, S.C.; SAVINO, D.; SILVERMAN, A.; STONE, M.J. et al. Characterization of skin- infiltrating lymphocytes in patient with psoriasis. **J Invest Dermatol**, 96: 3-9, 1991.
- OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, 39: 225-235, 1992.
- PARHAM, P.; LOMEN, C.E.; LAWLOR, D.A.; WAYS, J.P.; HOLMES, N; COPPIN, H.L. et al. Nature of polymorphism in HLA-A,-B,-C molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 85: 4005-4009, 1988.
- PARHAM, P.; OHTA, T. Population biology of antigen presentation by MHC Class I molecules. **Science**, 272: 67-74, 1996.
- POCIOT, F.; BRIANT, L.; JONGENEEL, C.V.; MOLVIG J.; WORSAAE H.; ABBAL, M. et al. Association oh tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- α by human mononuclear cells a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Immunol**, 23:224, 1993.

- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, 49: 1280-1283, 1995b
- ROCK, K.L.; GRAMM, C.; ROTHSTEIN, L.; CLARK, K.; STEIN, R.; DICK, L.; HWANG, D. et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell**, 79: 761-771, 1994.
- ROITBERG-TAMBUR, A.; FRIEDMANN, A.; ZFONI, E.E. et al. Do specific pockets of HLA C molecular involved in predisposition of psoriasis vulgaris in Jews. **J AM Acad Dermatol**, 31: 964-968, 1995.
- ROOD, M.J.; van KRUGTEN, M.V.; ZANELLI, E.; van der LINDEN, M.W.; KEIJERS, V.; SHREUDER, G.M. et al. Tnf-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, 43: 129, 2000.
- RUDENSKY, A.Y.; PRESTON-HURLBURT, P.; AL-RAMADI, B.K.; ROTHBARD, J.; JANEWAY, C.A. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. **Nature**, 359: 429-431, 1992.
- RUSSEL, J.T.; SCHULTES, M.L.; KUBAN, D.J. Histocompatibility antigens associated with psoriasis. **N Engl J Med**, 287: 738-739, 1972.
- SAIZAWA, K.; ROJO, J. & JANEWAY, C.A. Jr. Evidence for the physical association of CD4 and the CD3: α : β T-cell receptor. **Nature**, 328: 260-263, 1997.
- SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Erupções eritemato-escamosas. In: **Dermatologia**, 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 197-83, 2000.
- SANGUINETTI, C. J.; NETO, E. D.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17: 915-919, 1994.
- SCHMIDT-EGENOLF, M.; BOEHNCKE, W-H.; STÄNDER, M.; EIERMANN, T.H.; STERRY, W. Oligonucleotide typing reveals association of type I psoriasis with the HLA-DRB1*0701/2, - DQA1*0201, - DQB1*0303 extended haplotype. **J Invest Dermatol**, 100: 749-52, 1993

SCHMIDT-EGENOLF, M.; EIERMANN, T.H.; BOEHNCKE, W.H.; STANDER, M.; STERRY, W. Familial juvenil onset psoriasis associated with the human leukocyte antigen (HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-b57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303: a population- and family-based study. **J Invest Dermatol**, 106: 711-714, 1996.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. Excoffier L **Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SCHUMM, J. W. Genetic identity: new approaches to DNA fingerprint analysis., **Promega Notes**, 58: 12-20, 1996.

SODOYER, R.; DAMOTTE, M.; DELOVITCH, T.L.; TRUCY, J.; JORDAN, B.R.; STRACHAN, T. Complete nucleotide sequence of a gene encoding a functional human class I histocompatibility antigen (HLA-Cw3). **EMBO Journal**, 3: 879, 1984.

STENZEL, A.; TIMOTHY, L.; KOCH, W.A.; HAMPE, J.; GUENTHER, S.M.; DE LA VEGA, F.M. et al. Patterns of linkage disequilibrium in the MHC region on human chromosome 6p. **Hum Genet**, 114: 377-385, 2004

STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. **Am. J. Hum. Genet**, 68:978-989, 2001.

STRACHAN, T.; SODOYER, R.; DAMOTTE, M. & JORDAN, B.R. Complete nucleotide sequence of a functional class I HLA gene HLA-A3: implications for the evolution of HLA genes. **EMBO Journal**, 3: 887-894, 1984.

STRANGE, P.; COOPER, K. D.; HANSEN, E.R. T- lymphocyte clones initiated from lesional psoriatic skin release growth factors that induce keratinocyte proliferation. **J Invest Dermatol**, 101: 695-700, 1993.

STREILEIN, J.W. Speculation on the immunopathogenesis of psoriasis T cell violation of keratinocyte sphere of influence. **J Invest Dermatol**, 95: 20S-21S, 1990.

- SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, 43: 18-27, 1994
- SWERLICK, R.A.; CUNNINGHAM, M.W.; HALL, N.K. Monoclonal antibodies cross-reactive with group A streptococci and normal and psoriatic human skin. **J Invest Dermatol**, 87: 367-71, 1986.
- TARASSI, K.; CARTHY, D.; PAPASTERIADES, C.; BOKI, K.; NIKOLOPOULOU, N.; CARASSI, C. et al. HLA-TNF haplotype heterogeneity in Greek SLE patients. **Clin exp rheumatol**, 16: 66-68, 1998.
- TIWARI, J.L.; TERASAKI, P. HLA and Disease Associations, Springer, New York, 1988.
- TRACEY, K.J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S.F.; MERRYWEATHER, J.; WOLPE, S.; MILSARK, T.W.; HARIRI, R.J.; FAHEY, T.J.; ZENTELLA, A.; ALBERT, J.D. et al. shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, 234: 470-474, 1986.
- TREMBATH, R.C.; CLOUGH, R.L.; ROSBOTHAM, J.L. - Identification of a major susceptibility gene locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. **Hum Mol Genet**, 6: 813-20, 1997.
- TSUKAMOTO, K.; OHTA, N.; SHIRAI, H.; EMI, M.. A highly polymorphic (CA) repeat marker at in the human tumor necrosis factor alpha. **J.Human Genetics**, 43(4): 278-279, 1998.
- TURNER, D.M.; GRANT, S.C.; LAMB, W.R.; BRECHLEY, P.E.; DYER, P.A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. **Transplantation**, 60: 1113-1117, 1995.
- UDALOVA, I.A.; NEDOSPASOV, A.; WEBB, G.C.; CHAPLIN, D.D.; TURETSKAYA, R.L. Highly Informative Typing of the Human TNF Locus Using Six Adjacent Polymorphic Markers. **Genomics**, 16: 180-186, 1993.

VALDIMARSSON, H.; BAKER,B.S.;JONSDOTTIR,I.; FRY,L. Psoriasis: a disease of abnormal Keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. **Immunol Today**, 7: 256-9, 1986.

VALDIMARSSON, H.; BAKER, B.S.; JONSDOTTIR, I.; POWLES, A.; FRY, L. Psoriasis: a T-cell mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? **Immunol Today**, 16: 145-9, 1995.

VAN ELS, C.A.C.M.; D-AMARO, J.; POOL, J.; BLOKLAND, E.; BAKKER, A.; VAN ELSSEN, P.J. et al. Immunogenetics of human monor histocompatibility antigens: their polymorphisms and immunodominance. **Immunogenetics**, 35: 161-165, 1992.

VERJANS, G.M.; van der LINDEN, S.M.; van Eys, G.J.; de WAAL, L.P.; KIJLSTRA, A. Restriction fragment length polymorphisms in tumor necrosis factor region in patients with ankylosing spondylitis. **Arthritis Rheum**, 34: 486-489, 1991.

WARD,J. & STEPHENS, F. Inheritance of psoriasis in a Utah Kindred. **Arch Dermatol**, 84: 589-92, 1961.

WEISSENSTENER, T.H.; LANCHBURY, J.S. TNFB polymorphisms characterize three lineages of TNF region microsatellite haplotypes. **Immunogenetics**, 47: 6, 1997.

WILSON, A.G.; GORDON, C.; di GIOVAINE, F.S.; de VRIES, N.; van de PUTTE L.B.; EMERY, P. et al. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. **Eur J Immunol**, 24: 191-195, 1994.

WILSON, A.G.; de VRIES N.; van de Putte, L.B.; DUFF, G.W. A tumor necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthristis. **Ann Rheum Dis**, 54: 601-603, 1995b.

WILSON, A.G.; SYMONS, J.A.; McDOWELL T.L.; Di GIOVINE, F.S.; DUFF G.W. Effects of a TNF- alpha promoter base transition on transcriptional activity. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 3195-3199, 1997.

YANCOPOULOS, G.D.; BLACKWELL, T.K.; SUH, H.; HOOD, L. & ALT, F.W. Introduced T cell receptor variable regions gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common mechanism. **Cell**, 44: 251-259, 1986.

YANG, S.; GE, H-S; ZHANG, A.-P; WEI, S.-C; GAO, M.; WANG, H.-Y; CHEN, J.-J; LI, Y.; LIANG, H.; HE, P.; YANG, J.; ZHANG, J. Haplotype associations of the mHC with psoriasis vulgaris in Chinese Hans. **Clinical and Experimental Dermatology**, 29: 399-405, 2004.

ZAYKIN, D.V.; WESTFALL, P.H.; YOUNG, S.S.; KARNOUB, M.A.; WAGNER, M.J.; Ehm M.G. Testing association of statistically inferred haplotypes with discrete and continuous traits in samples of unrelated individuals. **Hum Hered**, 53:79-91, 2002.

ZHANG, X.; WEI, S.; YANG, S.; WANG, Z.; SHANG, A.; HE, P.; WANG, H. HLA-DQA1 and DQB1 alleles are associated with genetic susceptibility to psoriasis vulgaris in Chinese Han. **The International Society of Dermatology**, 43: 181-187, 2004.

8- ANEXOS

Tabela 15- Frequências absolutas e relativas dos haplótipos HLA-B, -C, obtidas com a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos métodos EM e PHASE.

Haplótipo	Psv I		Psv II		Psv Total		Controle		Total	
7-4	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
7-7	2	0,0182	1	0,0385	3	0,0221	12	0,0645	15	0,0466
7-12	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
8-5	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
8-7	2	0,0182	1	0,0385	3	0,0221	8	0,0430	11	0,0342
13-6	6	0,0545	2	0,0769	8	0,0588	0	0,0000	8	0,0248
14-2	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
14-4	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
14-8	4	0,0364	0	0,0000	4	0,0294	13	0,0699	17	0,0528
15-1	1	0,0091	1	0,0385	2	0,0147	0	0,0000	2	0,0062
15-2	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0108	2	0,0062
15-3	2	0,0182	0	0,0000	2	0,0147	10	0,0538	12	0,0373
15-4	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	2	0,0108	3	0,0093
15-7	3	0,0273	0	0,0000	3	0,0221	1	0,0054	4	0,0124
15-8	0	0,0000	1	0,0385	1	0,0074	2	0,0108	3	0,0093
15-12	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
15-14	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	4	0,0215	4	0,0124
18-2	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
18-5	2	0,0182	0	0,0000	2	0,0147	2	0,0108	4	0,0124
18-7	2	0,0182	1	0,0385	3	0,0221	1	0,0054	4	0,0124
18-8	0	0,0000	1	0,0385	1	0,0074	2	0,0108	3	0,0093
27-1	2	0,0182	0	0,0000	2	0,0147	0	0,0000	2	0,0062
27-2	2	0,0182	1	0,0385	3	0,0221	3	0,0161	6	0,0186
27-12	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
27-15	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	1	0,0054	2	0,0062
35-1	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
35-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
35-4	8	0,0727	4	0,1538	12	0,0882	16	0,0860	28	0,0870
35-8	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
35-12	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
35-15	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
37-2	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
37-6	4	0,0364	0	0,0000	4	0,0294	1	0,0054	5	0,0155
38-6	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
38-12	3	0,0273	0	0,0000	3	0,0221	3	0,0161	6	0,0186
39-1	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
39-4	0	0,0000	1	0,0385	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
39-7	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	3	0,0161	4	0,0124
39-12	8	0,0727	0	0,0000	8	0,0588	2	0,0108	10	0,0311
39-16	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0108	2	0,0062
40-3	2	0,0182	0	0,0000	2	0,0147	5	0,0269	7	0,0217
41-7	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
41-8	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
41-17	1	0,0091	1	0,0385	2	0,0147	1	0,0054	3	0,0093
42-1	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
42-17	0	0,0000	1	0,0385	1	0,0074	4	0,0215	5	0,0155

44-2	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	1	0,0054	2	0,0062
44-4	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	3	0,0161	4	0,0124
44-5	1	0,0091	1	0,0385	2	0,0147	9	0,0484	11	0,0342
44-7	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	3	0,0161	3	0,0093
44-8	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	3	0,0161	3	0,0093
44-12	2	0,0182	0	0,0000	2	0,0147	0	0,0000	2	0,0062
44-14	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
44-16	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	3	0,0161	3	0,0093
45-6	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	3	0,0161	4	0,0124
45-16	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0108	2	0,0062
47-4	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
48-4	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0108	2	0,0062
49-6	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
49-7	2	0,0182	1	0,0385	3	0,0221	1	0,0054	4	0,0124
49-17	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
50-6	3	0,0273	1	0,0385	4	0,0294	1	0,0054	5	0,0155
50-7	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
50-16	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
51-1	0	0,0000	1	0,0385	1	0,0074	2	0,0108	3	0,0093
51-4	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0108	2	0,0062
51-12	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
51-14	2	0,0182	0	0,0000	2	0,0147	1	0,0054	3	0,0093
51-15	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	7	0,0376	8	0,0248
51-16	2	0,0182	0	0,0000	2	0,0147	2	0,0108	4	0,0124
52-12	2	0,0182	1	0,0385	3	0,0221	1	0,0054	4	0,0124
52-15	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	1	0,0054	2	0,0062
52-16	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0108	2	0,0062
52-17	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
53-4	2	0,0182	1	0,0385	3	0,0221	3	0,0161	6	0,0186
55-3	3	0,0273	0	0,0000	3	0,0221	1	0,0054	4	0,0124
56-1	0	0,0000	1	0,0385	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
57-6	10	0,0909	1	0,0385	11	0,0809	2	0,0108	13	0,0404
57-7	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	2	0,0108	3	0,0093
57-18	3	0,0273	0	0,0000	3	0,0221	1	0,0054	4	0,0124
58-6	3	0,0273	0	0,0000	3	0,0221	3	0,0161	6	0,0186
58-7	1	0,0091	1	0,0385	2	0,0147	3	0,0161	5	0,0155
58-8	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
73-15	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
78-5	0	0,0000	1	0,0385	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
78-14	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
81-4	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
81-18	1	0,0091	0	0,0000	1	0,0074	0	0,0000	1	0,0031
82-8	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0054	1	0,0031
Total	110	1,0006	26	1,0007	136	1,0016	186	1,0012	322	0,9991

Tabela 16- Freqüências absolutas e relativas dos haplótipos do STR TNF, obtidas com a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos métodos EM e PHASE.

Haplótipo	PsV I		PsV II		PsV Total		Controle		Total	
1-5-1-3-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
1-5-2-2-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	1	0,0081	2	0,0083
1-5-2-4-3	2	0,0244	0	0,0000	2	0,0169	2	0,0161	4	0,0165
1-6-2-4-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
2-1-1-3-1	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
2-1-1-4-1	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0161	2	0,0083
2-1-2-3-1	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
2-1-2-4-1	7	0,0854	3	0,0833	10	0,0847	21	0,1694	31	0,1281
2-3-1-1-3	5	0,0610	1	0,0278	6	0,0508	4	0,0323	10	0,0413
2-3-1-4-3	0	0,0000	1	0,0278	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
2-3-2-4-1	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
2-4-1-1-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
2-5-2-4-3	8	0,0976	0	0,0000	8	0,0678	5	0,0403	13	0,0537
2-5-2-5-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
3-1-2-4-1	0	0,0000	1	0,0278	1	0,0085	2	0,0161	3	0,0124
3-3-1-1-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
3-5-2-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
4-3-2-3-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
4-4-1-3-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0161	2	0,0083
4-5-1-3-3	2	0,0244	0	0,0000	2	0,0169	6	0,0484	8	0,0331
4-5-1-4-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	3	0,0242	3	0,0124
4-5-1-7-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
4-5-2-5-3	0	0,0000	1	0,0278	1	0,0085	2	0,0161	3	0,0124
4-6-1-5-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
4-7-2-5-3	0	0,0000	1	0,0278	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
5-5-2-3-2	1	0,0122	1	0,0278	2	0,0169	0	0,0000	2	0,0083
5-5-2-5-3	1	0,0122	1	0,0278	2	0,0169	1	0,0081	3	0,0124
5-7-1-3-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
5-7-1-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
6-1-2-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	2	0,0161	3	0,0124
6-1-2-5-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	1	0,0081	2	0,0083
6-3-1-5-3	0	0,0000	1	0,0278	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
6-4-1-3-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
6-5-1-3-3	5	0,0610	4	0,1111	9	0,0763	10	0,0806	19	0,0785
6-5-1-5-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2	0,0161	2	0,0083
6-5-1-6-3	2	0,0244	0	0,0000	2	0,0169	0	0,0000	2	0,0083
6-5-2-3-2	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
6-7-1-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
7-1-2-2-3	1	0,0122	1	0,0278	2	0,0169	1	0,0081	3	0,0124
7-4-1-3-3	2	0,0244	2	0,0556	4	0,0339	4	0,0323	8	0,0331
7-4-1-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
7-5-1-5-3	2	0,0244	0	0,0000	2	0,0169	0	0,0000	2	0,0083
7-5-1-6-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
7-5-2-4-3	1	0,0122	1	0,0278	2	0,0169	3	0,0242	5	0,0207
8-3-2-1-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041

8-5-1-3-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
9-3-2-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
9-4-1-5-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
9-4-2-2-3	2	0,0244	1	0,0278	3	0,0254	2	0,0161	5	0,0207
10-1-2-4-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
10-3-2-2-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
10-3-2-6-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
10-4-1-3-3	13	0,1585	4	0,1111	17	0,1441	18	0,1452	35	0,1446
10-4-1-4-1	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
10-4-1-4-3	2	0,0244	0	0,0000	2	0,0169	2	0,0161	4	0,0165
10-4-1-5-3	0	0,0000	1	0,0278	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
10-4-2-3-3	2	0,0244	0	0,0000	2	0,0169	0	0,0000	2	0,0083
11-3-1-3-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0081	1	0,0041
11-4-1-3-3	1	0,0122	6	0,1667	7	0,0593	7	0,0565	14	0,0579
11-4-1-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	1	0,0081	2	0,0083
11-4-1-5-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
11-6-1-3-3	0	0,0000	1	0,0278	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
12-4-1-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
13-4-1-4-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
13-4-1-5-3	3	0,0366	4	0,1111	7	0,0593	4	0,0323	11	0,0455
13-4-1-6-3	1	0,0122	0	0,0000	1	0,0085	0	0,0000	1	0,0041
Total	82	1,0003	36	1,0003	118	1,0001	124	1,0007	242	0,9993

PsV I = grupo de pacientes psoríase tipo I

PsV II = grupo de pacientes psoríase tipo II

PsV total = grupo total de pacientes com psoríase

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

Tabela 17- Estimativas de diversidade haplotípica em cada grupo amostral.

Amostras	Diversidade haplotípica $\pm$ SD		
	STR TNF	HLA	STR TNF + HLA
PsV I	0,9524 $\pm$ 0,0121	0,9733 $\pm$ 0,0057	0,9420 $\pm$ 0,0397
PsV II	0,9413 $\pm$ 0,0200	0,9785 $\pm$ 0,0207	1,0000 $\pm$ 0,0962
PsV total	0,9535 $\pm$ 0,0087	0,9736 $\pm$ 0,0050	0,9632 $\pm$ 0,0266
Controle	0,9361 $\pm$ 0,0115	0,9730 $\pm$ 0,0042	0,9842 $\pm$ 0,0237
Total	0,9446 $\pm$ 0,0068	0,9766 $\pm$ 0,0027	0,9698 $\pm$ 0,0128

TNFs= STR TNFa, b, c, d, e

HLAs= HLA-B, HLA-C

TNFs + HLAs= STR TNFa, b, c, d, e + HLA-B, HLA-C

PsV I = grupo de pacientes psoríase tipo I

PsV II = grupo de pacientes psoríase tipo II

PsV total = grupo total de pacientes com psoríase

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

Tabela 18- Valores de probabilidade obtidos através de teste exato de diferenciação haplotípica.

Pares de Amostras	Probabilidade de não-diferenciação (<i>p</i>)		
	STR TNF	HLA	STR TNF + HLA
PsV I vs. PsV II	0,1777 ± 0,0445	0,4807 ± 0,0443	0,1242 ± 0,0219
PsV I vs. Controle	0,2405 ± 0,0417	0,0000 ± 0,0000	0,3882 ± 0,0245
PsV II vs. Controle	0,4639 ± 0,0550	0,2765 ± 0,0681	0,9905 ± 0,0031
PsV total vs. Controle	0,6201 ± 0,0430	0,0000 ± 0,0000	0,9113 ± 0,0159

TNFs= STR TNFa, b, c, d, e

HLAs= HLA-B, HLA-C

TNFs + HLAs= STR TNFa, b, c, d, e + HLA-B, HLA-C

PsV I = grupo de pacientes psoríase tipo I

PsV II = grupo de pacientes psoríase tipo II

PsV total = grupo total de pacientes com psoríase

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

Tabela 20- Frequências absolutas e relativas dos haplótipos STR TNFa, b, c, d, e, HLA-B, -C, obtidas com a mesma constituição haplotípica evidenciada pelos métodos EM e PHASE.

Haplótipo	Psv I		Psv II		Psv Total		Controle		Total	
1-5-2-4-3-18-5	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
2-1-2-4-1-14-2	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
2-1-2-4-1-14-8	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	3	0,1500	4	0,0800
2-1-2-4-1-15-3	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0500	1	0,0200
2-1-2-4-1-55-3	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
2-5-2-4-3-57-6	6	0,2500	0	0,0000	6	0,2000	1	0,0500	7	0,1400
3-1-2-4-1-14-8	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0500	1	0,0200
4-5-1-3-3-44-5	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0500	1	0,0200
4-5-1-3-3-45-6	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0500	1	0,0200
5-5-2-5-3-14-8	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
6-5-1-3-3-35-4	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
6-5-1-3-3-47-4	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0500	1	0,0200
6-5-1-3-3-51-1	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0500	1	0,0200
6-5-1-6-3-15-4	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
6-5-2-3-2-15-3	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
7-5-1-5-3-81-18	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
7-5-2-4-3-41-17	0	0,0000	1	0,1667	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
9-4-1-5-3-51-16	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
9-4-2-2-3-35-4	0	0,0000	1	0,1667	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
10-4-1-3-3-15-6	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
10-4-1-3-3-38-12	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
10-4-1-3-3-39-12	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
10-4-1-3-3-49-3	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
10-4-1-4-1-14-4	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1	0,0500	1	0,0200
10-4-2-3-3-18-7	2	0,0833	0	0,0000	2	0,0667	0	0,0000	2	0,0400
11-4-1-3-3-7-7	0	0,0000	1	0,1667	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
11-4-1-3-3-44-5	0	0,0000	1	0,1667	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
11-4-1-3-3-58-7	0	0,0000	1	0,1667	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
11-4-1-5-3-14-8	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
12-4-1-4-3-73-15	1	0,0417	0	0,0000	1	0,0333	0	0,0000	1	0,0200
13-4-1-5-3-52-12	0	0,0000	1	0,1667	1	0,0333	1	0,0500	2	0,0400
Total	24	1,0005	6	1,0002	30	0,9993	20	1,0000	50	1,0000

PsV I = grupo de pacientes psoríase tipo I

PsV II = grupo de pacientes psoríase tipo II

PsV total = grupo total de pacientes com psoríase

Controle= grupo-controle de indivíduos sadios

DIFFERENTIAL ASSOCIATIONS OF HLA-A, -B, -C GENES AND TNF MICROSATELLITE POLYMORPHISM WITH PSORIASIS VULGARIS: A STUDY OF GENETIC PREDISPOSITION IN BRAZILIAN POPULATION

A. C. Biral¹, C. B. Cardoso¹, R. F. Magalhaes³, I. J. Wastowski⁵, R. Simoes⁵, L. A. Magna⁴, E. A. Donadi⁵, A. M. Tanaka³ and M. H. S. Kraemer^{1,2,*}

¹Immunogenetics Transplant Laboratory, Department of Clinical Pathology; ²Clinical Pathology Department; ³Department of Dermatology; ⁴Department of Medical Genetics, School of Medical Science, State University of Campinas, Campinas; ⁵Immunology Molecular Laboratory, Clinical Hospital, Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

SUMMARY

Psoriasis is a genetically chronic inflammatory skin disorder and genes involved in predisposition the disease are located within the highly polymorphic major histocompatibility complex (MHC) region on the chromosome 6p21.3. Our goal was to investigate the genetic association of HLA class I genes and tumor necrosis factor (TNF-alpha) microsatellites with psoriasis vulgaris in Brazilian patients. HLA-A, -B, -C typing was carried out in 92 psoriasis patients and 160 healthy individuals using a PCR-SSP method. Out of these 92 psoriasis patients, 70 patients were typed using PCR technique, followed by a revealing denaturing acrylamide gel to analyze the frequency of five microsatellites polymorphisms, TNFa, b, c, d, e. Of the 92 patients, 43,4% were found to be HLA-Cw*06 positive, ($p<0.0001$ and $RR=4.3$). The HLA- A*30 B*13 Cw*06 and A*02 B*57 Cw*06 haplotypes were found to be increased when compared to healthy individuals. TNF-alpha microsatellites were found to be decreased, i.e., TNFa4, TNFb1, TNFe1, with $p<0.02$, $p<0.01$ and $p<0.002$, respectively and TNFa2b1c2d4e1 haplotype, when compared to healthy individuals. This study shows that the positive association between HLA-B*13, -B*57, -Cw*06, -Cw*12 and A*02 B*57 Cw*06 and A*30 B*13 Cw*06 haplotypes could determine the susceptibility to development of psoriasis. We further found microsatellite TNFa4, TNFb1, TNFe1 and a TNFa2b1c2d4e1 haplotype with negative association, which suggests a protection factor in psoriasis. Results point towards the fact that detection of polymorphisms of the HLA class I and microsatellite TNF locus may be a marker of genetic predisposition of this disease.

* Address for proofs and reprints: Prof. Dr. Maria-Helena Stangler Kraemer, Clinical Pathology Department, School of Medical Science, Rua Gustavo Rodrigues Dória, 255, 13083-060 Campinas (SP) Brasil, Fone: (19) 3289-3273 Fax: (19) 3788-9434, e-mail: kraemer@fcm.unicamp.br.

DIFFERENTIAL ASSOCIATIONS OF HLA-A, -B, -C GENES AND TNF MICROSATELLITE POLYMORPHISM WITH PSORIASIS VULGARIS: A STUDY OF GENETIC PREDISPOSITION IN BRAZILIAN POPULATION

INTRODUCTION

Psoriasis vulgaris is a chronic inflammatory skin disorder characterized by hyperproliferation and recruitment of T lymphocytes and mononuclear cells in affected skin (FARBER et al., 1974; MARTÍNEZ-BORRA et al., 2003). It is characterized by abnormal proliferation and complex alterations in epidermal differentiation, as well as a high number of biochemical, immunologic, inflammatory, and vascular abnormalities. Distribution of psoriasis in world population varies according to ethnic groups and geographical locations, with a peak incidence of approximately 3% of the population (BARKER, 2001). In Brazilian population, constituted of Caucasian from Europe, Brazilian Amerindian and the African-American (LOUZADA-JUNIOR, et al., in press), incidence of psoriasis is between 1% and 2%. Onset of disease before the age of 40 is called type I and after the age of 40 is called type II, which leads to the hypothesis that there are actually two forms of psoriasis (HENSELER & CHRISTOPHERS, 1985). Males and females are affected equally. (BARKER, 2001). The cause of psoriasis is unknown, but its heritage mode is currently considered to be multifactorial. One hypothesis refers to a genetic predisposition, which implies the effect of diverse genes and includes several triggering factors, which in turn play an important role in the expression of the disease (BOWCOCK & BARKER, 2003).

The HLA system contains a set of tightly linked genes with the major histocompatibility complex (MHC) located on chromosome 6. The genes of the HLA system are main susceptibility determiners in autoimmune diseases. These genes codify cell surface molecules which serve as identity markers and play a major role in recognition of antigen. HLA gene population displays a linkage disequilibrium phenomena, where specific allele pairs of different HLA genes are inherited along with a much higher frequency than expected by chance (PIAZZA & LONJOU, 1997).

A high number of studies have demonstrated that genes, particularly those contained within the major histocompatibility complex (MHC), on chromosome 6, confer susceptibility to psoriasis and influence disease development (BHALERAO & BOWCOK, 1998). Several associations were related to increase of frequencies in class I and II HLA among patients of different ethnic groups (ELDER et al., 1994; CHOONHAKARN, 2002; KRAEMER, et al., 2000).

Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) is a key pro-inflammatory cytokine in the development of psoriasis with many biological activities. Its is regulated by the TNF gene cluster which displays a high level of polymorphism (POCIOT et al., 1993; HASHIGUCCI et al., 2003) and is encoded within the class III region, on chromosome 6, with a length of 250kb centromeric to the HLA class genes. TNF locus are 12kb in length, contain several polymorphic areas and include five microsatellites, TNFa, b, c, d, e (HÖHLER et al., 2002).

The possible associations of HLA class I genes polymorphism with the five microsatellite markers in the TNF locus have been examined in different populations and results of different studies have shown strong linkage disequilibrium between certain alleles of these microsatellites and both MHC class I and class II loci (HAJEER & HUTCHINSON, 2001). Therefore, alleles from polymorphic loci physically linked and that occupy a small chromosomal extension form useful haplotypes to infer population background, as well for studies on association with diseases (FOISSAC et al., 2000).

The goal of the present study was to analyze involvement of the HLA class I region genes and TNF- α microsatellites of the MHC regarding genetic predisposition to psoriasis vulgaris. Therefore, we evaluated the distribution of HLA-A, -B, -C alleles and haplotypes and TNFa, b, c, d, e microsatellites in a group of patients with psoriasis vulgaris and the healthy control group in order to determine which associations were involved with genetic risk factors in psoriasis vulgaris, in the two subtypes of psoriasis in Brazilian patients to better understand the pathogenesis of the disease.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls

Typing of class I HLA genes was carried out in 92 patients with psoriasis and diagnosed according to clinical criteria (SAMPAIO & RIVITTI, 2000). They were between 10 and 80 years old, attended the Dermatology Ambulatory of the Clinical Hospital of the University of Campinas and were recruited between March 2002 and March 2003. All patients came from Campinas, southeastern region of the state of São Paulo (Brazil) and were examined for their class I HLA genes. 70 patients were type I psoriasis (onset of disease before the age of 40) and 22 patients were type II psoriasis (onset of disease after the age of 40). Patients were chosen at random regarding onset of disease. Out of those 92 psoriasis patients, 49 type I and 21 type II (total 70 patients) were studied regarding the five microsatellite markers in the TNF locus.

Typing of class I HLA genes was further performed in a healthy control group of 160 individuals aged between 18 and 53 from the same geographical region as patients, none of whom was related to them. They were considered representative of the southeastern Brazilian population

and they fairly correspond to the regional distribution of the patients panel studied for HLA class I genes. Out of those 160 healthy controls, 71 were chosen to study the five microsatellite markers in the TNF locus.

Typing of alleles was performed at the Transplantation Immunogenetics Laboratory, Clinical Hospital, Division of Clinical Pathology, school of Medical Science, UNICAMP, which is accredited to perform clinical HLA typing by the “Serviço Único de Saúde – SUS” and the Brazilian Association of Histocompatibility, BAH.

Genomic DNA extraction from peripheral blood mononuclear cells:

Ten milliliters of heparinized blood were obtained from psoriasis patients. Genomic DNA was isolated from leukocytes from anticoagulated blood using a salting out procedure (MULLER et al., 1988), precipitated with isopropyl alcohol and resuspended in sterile water. The DNA concentration (optical density 260) and purity (optical density 260/280) were determined using a spectrophotometer. The DNA obtained had a purity of 1.6-1.8 and was suitable for PCR analysis.

PCR/SSP typing

HLA-A, -B, -C alleles were differentiated on a intermediate resolution level in psoriasis patients and healthy individuals, using microplates with 96 wells containing the specific sequence primers (PCR/SSP) (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), 21 reactions for HLA-A specificities, 36 reactions for HLA-B allele, and 14 reactions for HLA-C allele, according to the methodology developed by Olerup and Zetterquist (OLERUP & ZETTERQUIST, 1992). PCR reaction was analyzed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 2% agarose gel. Presence of the specific PCR product was visualized by a (UV) transilluminator and documented by photographs.

TNF microsatellite

The TNFa, b, c, d and e microsatellite alleles were amplified using PCR with primers described by Udalova et al. (1993) (Table 1). An Applied Bioystems Thermal Cycler was used for all PCR reactions and a general set of conditions and reagents was used for amplification of all loci. The total reaction volume for each sample was 21µl for all amplifications; for PCR, we used 2µl (100ng/µl) of genomic DNA, 10X PCR buffer, MgCl₂ (50mM), 20mM for each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 0,2µM for each 3' and 5' primer and 0,10 µl for Taq polimerase (5U/µl). Amplification was carried out in 30 cycles for the PCR of the TNFc and the first PCR of the TNFa and TNFb loci, as described by Udalova et al. (1993), with small modifications in the amplification

programs. Each cycle consisted of denaturation at 94°C for 60s; 61°C for 60s and 72°C for 60s. PCR of the TNFd and TNFe loci and the second PCR of the TNFa and TNFb loci consisted of 34 cycles. Each cycles consisted of denaturation at 94°C for 50s; 60°C for 30s, and 72°C for 40s.

To visualize amplified products, samples were applied in denaturing vertical gels of acrylamide (12%), submitted to specific electrophoretic conditions for each locus and visualized according to Sanguinetti et al. (1994).

Statistical analysis

Allele frequencies (Fa) were calculated using the following formula: $Fa (\%) = (n/2N) \times 100$, when n = sum of a particular allele and N = total number of individuals. Maximum likelihood estimates of haplotype frequencies were obtained using an expectation-maximization (EM) algorithm included in the program package Arlequin (SCHNEIDER et al., 1997). The significance association between HLA alleles and STR-TNF alleles in psoriasis patients compared with the control group were assessed using Fisher's Exact Test. The corrected P-value (Pc) was obtained by multiplying the P-value by the number of measured alleles detected at each locus. A level of $Pc < 0.05$ was accepted as statistically significant.

RESULTS

Analysis of class I HLA alleles (HLA-A, -B, -C) using PCR/SSP

Frequencies of distribution of alleles found in our 92 psoriasis patients and 160 healthy control individuals are shown in Table 2. Significant differences in frequencies were found in four alleles: HLA-B*13 (6.5% in psoriasis patients vs. 0.3% in healthy controls, $pc < 0.003$), HLA-B*57 (8.7% in psoriasis patients vs. 1.9% in healthy controls, $pc < 0.02$), HLA-Cw*06 (21.7% in psoriasis patients vs. 5% in healthy controls, $pc < 0.001$), HLA-Cw*12 (12.5% in psoriasis patients vs. 4.7% in healthy controls, $pc < 0.03$) (Figure 1).

Assessment of allelic frequencies and significance in type I and II psoriasis patients showed that HLA-B*13, -B*57, HLA-Cw*06, and -Cw*12 alleles were significantly increased in type I psoriasis ($p < 0.05$) when compared to the healthy control group; in type II psoriasis, HLA B*13 allele was statistically significant ($pc < 0.03$) (Table 3).

Class I HLA haplotypes

Haplotype frequencies were obtained through probabilistic estimates calculated using the *Arlequin* software (SCHNEIDER et al., 2000). HLA-A*30, -B*13, -Cw*06 and HLA-A*02, -B*57,

-Cw*06 haplotypes showed increased frequencies in psoriasis patients when compared to the healthy control group (2.71% vs. 0.31%, $p<0.02$ and 4.89% vs. 0%, $p<0.0001$).

TNF microsatellite frequency distribution analyses

Table 4 shows allele frequency of the five microsatellites loci. The TNFa locus is the most polymorphic one, containing 14 alleles. We detected a decrease in distribution of a4, b1, and e1 alleles in psoriasis patients ($p<0.02$, $p<0.01$, $p<0.002$, respectively) (Figure 2) when compared with the healthy control group, which lose their significance after being corrected by the number of investigated alleles, i.e., the TNFa4 e TNFb1 alleles. The e1 allele remained very significant after correction ($pc<0.006$).

Distribution of allelic frequencies and significance in type I and type II psoriasis patients were found to be decreased in TNFa4, b1, and e1 alleles regarding type I psoriasis, and a4 e b1 alleles lost their significance after correction. The TNFe1 allele maintained its significance ($pc<0.01$). Type II psoriasis patients when compared to the healthy control group did not show any statistical significance (Table 5).

TNF microsatellites haplotypes

Frequencies of haplotypes were obtained through probabilistic estimates calculated using the Arlequin software (SCHNEIDER et al., 2000). The a2b1c2d4e1 haplotype in psoriasis patients showed decreased frequencies, in comparison to the health control group (6.42% vs. 15.26%, $p<0.02$).

DISCUSSION

It is now clear that the genetic basis of psoriasis is complex, and that its role varies among patients and their families (genetic heterogeneity) (BARKER, 2001). Linkage and association analyses have shown that the major histocompatibility complex (MHC) is the major genetic determinant related to psoriasis susceptibility, and that in the MHC, the HLA-Cw*06 is the allele that shows the strongest association with psoriasis (MARTÍNEZ-BORRA et al., 2003).

Studies carried out with TNF microsatellite markers examined production of TNF α and pathogenesis of many different diseases (NIIZEKI et al., 2001; WEISSENSTENER & LANHBURY, 1997; POCIOT et al., 1993).

In the present study, we determined HLA class I genotyping and the five TNF α microsatellites markers. Analysis of these polymorphic markers, which are associated to both the forms of the disease (type I and type II), allowed us to suggest the segment associated to susceptibility in psoriasis in Brazilian patients.

HLA-B*13, -B*57, Cw*06 e -Cw*12 alleles showed increased significant frequencies in patients with psoriasis and especially in type I psoriasis; however, only the HLA-B*13 allele was significant in type II psoriasis when compared to healthy controls. The HLA allele associations in patients with type I psoriasis have also been described in other studies (CHOONHAKARN et al., 2002). The HLA-Cw*06 allele shows an important increase in relative risk for psoriasis in almost all the tested populations and that important increase in frequencies occurs in spite of the differences between genetic groups. In the present study, the HLA-Cw*06 allele was associated with 43.4% of psoriasis patients (21.7% of patients with psoriasis compared to 5.0% of controls, $p < 0.0001$). A strong linkage disequilibrium between the HLA-Cw*06 and the B*13 and B*57 was also established. Haplotypes with those two alleles and the HLA-Cw*06 are frequently present in psoriasis patients. Further, HLA-A*30, -B*13, -Cw*06 haplotypes and HLA-A*02, -B*57, -Cw*06 showed a strong association to psoriasis in the present research.

Analysis of the five TNF microsatellites markers in patients with psoriasis determined a decrease in frequency of the TNFa4, b1, e1 alleles and of the TNFa2 b1 c2 d4 e1 haplotype when compared to the healthy control group. The same decreased alleles were found in type I psoriasis patients; however, the a4 and b1 alleles lost their significance after correction and no significant allele was found in type II psoriasis patients. Results regarding those negative association suggests that the TNFe1 allele be a protection factor against the illness.

The high degree of polymorphism of the MHC, the sequence and the presence of genes vary between haplotypes. The results of our study show association with susceptibility of HLA class I alleles, HLA-B*13, -B*57, -Cw*06, Cw*12 and HLA-A*30,-B*13, -Cw*06, HLA-A*02, -B*57, -Cw*06 haplotypes. The data confirmed the findings of other studies from our laboratory that suggest that there are genes of susceptibility for HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ (KRAEMER et al., 2000; BIRAL et al., 2003). Results also show negative association with the TNFe1 microsatellite allele and the TNFa2 b1 c2 d4 e1 haplotypes with psoriasis vulgar in Brazilian patients. Association of HLA B*13 allele with type II psoriasis was also found, which suggests genetic involvement in patients with late onset of disease.

REFERENCES

- BARKER, J.N. (2001) Genetic aspects of psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 26: 321-325.
- BHALERAO, J.; BOWCOK, A.M. (1998) The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Hum Mol Genet*, 7: 1537-45.
- BIRAL, A.C.; CARDOSO, C.B.; MAGALHAES, R.F.; MAGNA L. A.; TANAKA, A. M.; KRAEMER, M.H. (2003) Association of psoriasis with specific alleles of the HLA-B*57 CW*06; B*13 CW*06 haplotypes in Brazilian patients: in search of genetic susceptibility. *Hum Immunol*, 64(10 Suppl):S137.
- BOWCOCK, A.M.; BARKER, J.N. (2003) Genetics of psoriasis: The potential impact on new therapies. *J Am Acad Dermatol*, 49:S51-6.
- CHOONHAKARN, C.; ROMPHRUK, A.; PUAPAIROJ, C.; JIRARATTANAPOCHAI, K.; ROMPHRUK, A.; LEELAYUWAT, C. (2002) Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais. *International Journal of Dermatology*, 41:6, 330-334.
- ELDER, J.T.; NAIR, R.P.; GUO, S.W. et al. (1994) The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol*, 130: 216-224.
- FARBER, E.M.; NALL, L.; WATSON, W. (1974) Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Immunol Rev*, 109:207-11.
- FOISSAC, A, SALHI M, CAMBON-THOMSEN A. (2000) Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens*, 55(6):477-509.
- Hajeer A.H, HUTCHINSON I.V. (2001) Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease. *Hum Immunol*, 62(11):1191-9.
- HASHIGUCCI K., NIIZEKI H, NARUSE T, OTA M, INAMOTO N, NISHIKAWA T, INOKO H. (2003) A clinical feature associated with polymorphisms of the TNF region in Japanese patients with palmoplantar pustulosis. *Hum Immunol*, 64(5):530-7.
- HENSELER, T.; CHRISTOPHERS, E. (1985) Psoriasis of early and late onset: characterization of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 13:450-6.
- HÖHLER, T.; GROSSMANN, B.; STRADMANN-BELLINGHAUSEN, B.; KALUZA, W.; REUSS, E.; VLAM, DE K.; VEYS, E.; MÄRKER-HERMANN, E. (2002) Differential association of polymorphisms in the TNF α region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis*, 61:213-218.
- LOUZADA-JUNIOR, P.; DEGHAIDE, N.H.; ARAUJO, M.B.; SMITH, A.G.; KRAEMER, M.H.S.; DONADI, E.A. Population: Brazilian (Admixed, African and European), Northeast region of State of São Paulo, Brazil. HLA 2004: Immunobiology of the Human MHC, IHWG Press.

KRAEMER, M.H.S.; UTHIDA-TANAKA, A.M.; OLIVEIRA, V.C.; BIRAL, A.C.; CARDOSO, C.B.; MAGALHÃES, R.F.; MAGNA, L.A. (2000) Early-onset of Psoriasis in Brazilian patients: Support for HLA-Class I and Class II Analysis. In: SIRISINHA, S.; CHAIYAROJ, S.C.; TAPCHASRI, P. (Ed.) 2nd Congress of the Federation of Immunological Society of Asia-Oceania. Bologna, Italy: Monduzzi Editore, International Procedures Division, vI; 69-73.

MARTÍNEZ-BORRA, J.; GONZÁLEZ, S.; JUANES-SANTOS, J.; SÁNCHEZ DEL RIO, J.; ALONSO-TORRE, J.C.; VÁSQUEZ-LÓPEZ, A.; BLANCO-GELÁZ, M.A.; LÓPEZ-LARREA, C. (2003) Psoriasis vulgaris and psoriatic arthritics share a 100 kb susceptibility region telomeric to HLA-C. *Rheumatology*, 42:1089-1092.

MULLER, C.A.; HASMANN, R.; GROSSE WILDE H. et al. (1988) Significant association of acute lymphoblastic leukemia with HLA-Cw7. *Genetic Epimiology*, 5:453-461.

NIIZEKI, H.; NARUSE, T.; HECKER, K.H.; TAYLOR, J.R.; KURIMOTO, I.; SHIMIZU, T.; YAMASAKI, Y.; INOKO, H.; STREILEIN, J.W. (2001) Polymorphisms in the TNF genes are associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. *Tissue Antigens*, 58: 369.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39: 225-235.

PIAZZA, A.; LONJOU, C. (1997) HLA in Europe and other Mediterranean countries. In Genetic diversity of HLA. *Functional and medical implications*. Vol I. (ed D. Charron), pp. 374-386. Paris. EDK.

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

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Erupções eritemato-escamosas. In: *Dermatologia*, 2^a ed. São Paulo: Artes Médicas, 197-83, 2000.

SANGUINETTI, C. J.; NETO, E. D.; SIMPSON, A.J.G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. Excoffier L (2000) *Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

UDALOVA, I.A.; NEDOSPASOV, A.; WEBB, G.C.; CHAPLIN, D.D.; TURETSKAYA, R.L. (1993) Highly Informative Typing of the Human TNF Locus Using Six Adjacent Polymorphic Markers. *Genomics*, 16:180-186.

WEISSENSTENER, T.H.; LANCHBURY, J.S. (1997) TNFB polymorphisms characterize three lineages of TNF region microsatellite haplotypes. *Immunogenetics*, 47: 6.

Table 1. Primers used for TNF α microsatellite typing.

Primer	5' - 3'
TNFa	GCC TCT AGA TTT CAT CCA GCC ACA CCT CTC TCC CCT GCA ACA CAC A
TNFb	GCA CTC CAG CCT AGG CCA CAG A GTG TGT GTT GCA GGG GAG AGA G
TNFc	GGT TTC TCT GAC TGC ATC TTG TCC TCA TGG GGA GAA CCT GCA GAG AA
TNFd	AGA TCC TTC CCT GTG AGT TCT GCT CAT AGT GGG ACT CTG TCT CCA AAG
TNFe	GTG CCT GGT TCT GGA GCC TCT C TGA GAC AGA GGA TAG GAG AGA CAG

Udalova (1993)

Table 2. Distribution of frequencies (%) and of HLA-A, -B, -C alleles in psoriasis patients and in healthy control group.

Psoriasis			Control			Psoriasis			Control		
Allele			Allele			Allele			Allele		
HLA-A*	n=92	n=160	HLA-B*	n=92	n=160	HLA-Cw*	n=92	n=160	HLA-Cw*	n=92	n=160
	Fa %	Fa %		Fa %	Fa %		Fa %	Fa %		Fa %	Fa %
*01	6.5	9.4	*07	4.9	8.1	*01	3.8	2.8			
*02	22.8	25.9	*08	4.3	5.9	*02	3.2	3.7			
*03	7.6	7.8	*13	6.5	0.3	*03	5.4	8.4			
*11	1.6	4.7	*14	3.8	5.6	*04	13	14.4			
*23	2.1	2.1	*15	7.1	10.3	*05	2.7	5			
*24	8.6	9.7	*18	4.3	3.7	*06	21.7	5			
*25	0.0	0.6	*22	0.0	0.0	*07	14.1	16.9			
*26	3.8	3.4	*27	3.8	1.8	*08	3.8	8.4			
*29	1.1	2.8	*35	8.7	8.7	*12	12.5	4.7			
*30	6.5	4.1	*37	2.7	0.6	*14	1.6	3.4			
*31	1.1	2.8	*38	2.7	2.1	*15	2.1	5.3			
*32	2.7	3.7	*39	6.5	3.4	*16	1.6	4.4			
*33	2.1	3.4	*40	1.6	2.5	*17	1.6	2.8			
*34	0.0	1.5	*41	1.6	0.9	*18	2.1	0.3			
*36	0.5	0.9	*42	0.5	1.8						
*66	1.1	0.3	*44	3.2	10.3						
*68	3.8	5.9	*45	0.5	1.8						
*74	0.0	0.9	*47	1.1	0.9						
			*48	0.0	0.6						
			*49	2.7	2.1						
			*50	3.2	0.9						
			*51	4.9	7.1						
			*52	2.1	2.1						
			*53	2.1	0.9						
			*55	1.6	0.6						
			*56	0.5	0.0						
			*57	8.7	1.8						
			*58	3.8	2.8						
			*67	0.0	0.3						
			*73	0.5	0.0						
			*78	0.5	0.3						
			*81	0.5	0.3						
			*82	0.0	0.3						

Fa (%) = (n/2N) x 100

n= sum of a particular allele

N= total number of individuals

Table 3. Distribution of frequencies (%) and statistical significance in HLA-A, -B, -C (HLA class I) alleles in patients with onset of disease before the age of 40 (type I) and with onset of disease after the age of 40 (type II).

HLA Alleles	Control n=160	Type I				Type II			
		PsV n=70	<i>p</i>	<i>pc</i>	RR	PsV n=22	<i>p</i>	<i>pc</i>	RR
HLA-B*13	(1) 0.3%	(8) 5.7%	0.0005	0.02	18	(4) 9.1%	0.0009	0.03	29.1
HLA-B*57	(6) 1.9%	(15) 10.7%	0.0001	0.004	5,6	(1) 2.3%	ns		
HLA-Cw*06	(16) 5.0%	(35) 25%	0.0001	0.001	6,2	(5) 11.4%	ns		
HLA-Cw*12	(15) 4.7%	(18) 12.9%	0.003	0.04	2,9	(4) 9.1%	ns		

ns = not significant

Table 4. Distribution of frequencies (%) of alleles of TNF microsatellites in patients (n=70) and healthy control group (n=71).

Alleles	TNFa		TNFb		TNFc		TNFd		TNFe	
	PsV	Control	PsV	Control	PsV	Control	PsV	Control	PsV	Control
1	0.02	0.04	0.12	0.23	0.61	0.60	0.06	0.05	0.09	0.22
2	0.20	0.28	0.00	0.007	0.39	0.40	0.05	0.03	0.06	0.01
3	0.02	0.01	0.10	0.07			0.38	0.42	0.86	0.77
4	0.04	0.12	0.40	0.35			0.31	0.38		
5	0.06	0.02	0.32	0.30			0.16	0.10		
6	0.14	0.13	0.007	0.03			0.03	0.01		
7	0.10	0.08	0.03	0.007						
8	0.007	0.007	0.00	0.00						
9	0.04	0.02	0.007	0.00						
10	0.19	0.17								
11	0.08	0.07								
12	0.007	0.00								
13	0.06	0.03								
14	0.007	0.00								

Table 5. Frequencies of TNF microsatellite alleles in patients with type I and type II psoriasis which showed statistical significance.

Alleles	Control	Type I				Type II			
		PsV				PsV			
STR-TNF	n=71	n=49	<i>p</i>	<i>pc</i>	RR	n=21	<i>p</i>	<i>pc</i>	RR
TNFa4	(17) 12%	(3,0) 3.1%	0.01	ns	0.26	(3,0) 7.1%	ns		
TNFB1	(33) 23%	(12) 12.2%	0.04	ns	0.52	(5,0) 12%	ns		
TNFe1	(31) 22%	(8,0) 8.2%	0.004	0,01	0.37	(4,0) 9.5%	ns		

ns = not significant

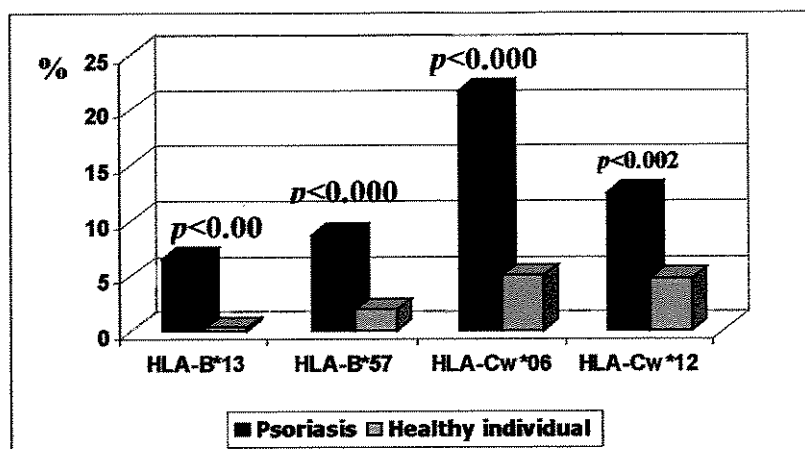


Figure 1. Frequencies of HLA-A, -B, -C (class I) alleles in patients with psoriasis (n=92) and healthy controls (n=160) which showed statistical significance.

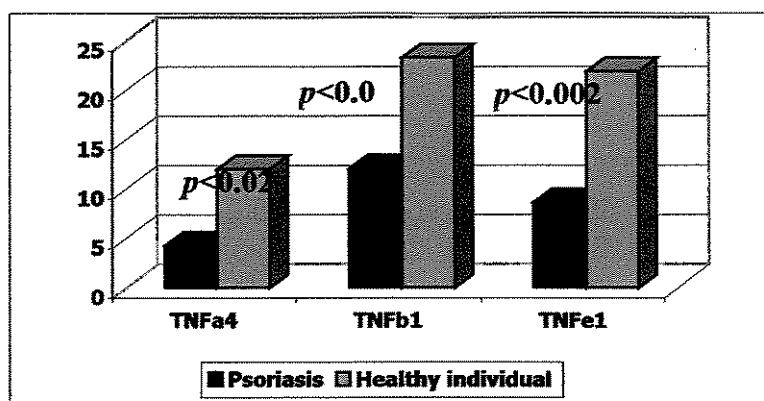


Figure 2. Frequencies of TNF microsatellites alleles of patients with psoriasis (n=70) and healthy controls (n=71) which showed statistical significance.