

RENATA FERREIRA MAGALHÃES

**POLIMORFISMOS DOS GENES HLA E REGIÕES
PROMOTORAS DO TNF- α -238 E -308 COMO FATORES DE
SUSCEPTIBILIDADE À PSORÍASE E GRAVIDADE DA
DOENÇA**

CAMPINAS

UNICAMP

2009

RENATA FERREIRA MAGALHÃES

**POLIMORFISMOS DOS GENES HLA E REGIÕES
PROMOTORAS DO TNF- α -238 E -308 COMO FATORES DE
SUSCEPTIBILIDADE À PSORÍASE E GRAVIDADE DA
DOENÇA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de Clínica Médica.*

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

Docente do Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas

Chefe do Laboratório de Imunogenética do Hospital das Clínicas da UNICAMP

CAMPINAS

UNICAMP

2009

UNIDADE 9C
Nº CHAMADA
T/UNICAMP M27p
V
TOMBO BCI 23730
PROC 16.48.09
C D 8
PREÇO R\$11,00
DATA 10-11-09
CÓD TIT 468568

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

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

M27p Magalhães, Renata Ferreira
Polimorfismos dos genes HLA e regiões promotoras do TNF- α -238 e -308 como fatores de susceptibilidade à psoríase e gravidade da doença / Renata Ferreira Magalhães. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Maria Helena Stangler Kraemer
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biologia Molecular. 2. Dermatologia. 3. Imunogenética. 4. Fator de Necrose Tumoral alfa. 5. Complexo Principal de Histocompatibilidade. 6. Fatores de risco. 7. Psoríase. I. Kraemer, Maria Helena Stangler. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : HLA and TNF-Alpha promoter regions -238 and -308 polymorphisms as markers of susceptibility to psoriasis and severity of the disease

Keywords: • Molecular Biology
• Dermatology
• Immunogenetics
• Tumor Necrosis Factor-alpha
• Major Histocompatibility complex
• Risk factors
• Psoriasis

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Profª. Drª. Maria Helena Stangler Kraemer
Profª. Drª. Valéria Petri
Profª. Drª. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto
Profª. Drª. Elemir Macedo de souza
Profª. Drª. Ricardo de Lima Zollner

Data da defesa: 29-05-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Renata Ferreira Magalhães

9,
1753

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Stangler Kraemer

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Valéria Petri

2. Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza

3. Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

4. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

5. Prof^a. Dr^a. Maria Helena Stangler Kraemer

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

Data: 29/05/2009

DEDICATÓRIA

À minha mãe **Iliana** e ao meu pai **Sérgio**

pela incansável determinação em nos fazer crescer
e por sempre caminharem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido **Adalton**,

pelo amor e compreensão em todas as horas.

Às minhas irmãs **Tânia, Paula e Cláudia**
e toda a família, que são as melhores coisas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a Maria Helena Stangler Kraemer,
minha gratidão pelas horas dedicadas à orientação deste trabalho.
Sua amizade e sábios conselhos permitiram-me chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner,
pelo apoio imprescindível para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Aos mestres

À Dra. Ana Maria Uthida-Tanaka,
que, com muito amor e dedicação, criou a oportunidade de eu estar aqui.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho,
amigo e companheiro de trabalho, devotado ao ensino e à pesquisa, que
sempre orientou minha caminhada.

À Prof^a Dr^a. Aparecida Machado de Moraes,
pela presença apaziguadora e palavras de incentivo e carinho.

Ao Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza,
um exemplo de pessoa e de dermatologista que sempre tentarei seguir. Jamais
esquecerei seus ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é o resultado do trabalho de muitas pessoas e é difícil expressar a todos o sentimento de gratidão e de respeito.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética, **Arthur, Margareth, Vera** e, em especial, **Ana Cristina**, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi**, por prontamente ter me acolhido em seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes-Júnior**, pela luz oferecida frente às dificuldades da estatística.

Aos membros da banca de qualificação, **Prof^a. Dr^a. Aparecida Machado de Moraes** e **Prof^a. Dr^a. Leonilda Maria Barbosa dos Santos** que muito contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

A **João Alexandre Três Pancoto**, pela orientação no Laboratório de Imunologia de Ribeirão Preto.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Letícia Cintra**, que contribuiu gentilmente com ilustrações para este trabalho e por ser a pessoa maravilhosa que todos conhecemos.

À **Michelle Ethienne Florence, Cristina D.B. Figueira de Mello** e **Leonardo Ávila Ferreira**, colegas de trabalho que tantas vezes substituíram-me para que eu cuidasse dos assuntos da tese. Orgulho-me dos nossos ex-residentes.

A **Bruno Lania**, pela contribuição em informática, sem o que seria difícil escrever este trabalho.

Às secretárias da Pós-Graduação, **Adriana, Cristiane** e **Renata**, que sempre me ajudaram com as questões burocráticas.

Aos **residentes da Dermatologia**, que são amigos do coração e sofreram com a atribulação do final desta tese.

Aos indivíduos que participaram da pesquisa, a pedra fundamental de todos os meus trabalhos.

À **FAEP**, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização de parte desta empreitada.

A todas as graças recebidas, para o que não tenho palavras.

"The animal and human bodies great forces lying latent could be called into action by appropriate stimuli".

Von Behring's (1905)

apud Kraemer MHS. O Complexo de Histocompatibilidade Principal e sua relação com a doença de Graves.[Tese de Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1989.

RESUMO

Psoríase é uma dermatose inflamatória crônica, determinada por desregulação do sistema imune e associada a várias comorbidades. O marcador genético mais associado à psoríase em todas as populações é o HLA-Cw*06. Polimorfismos na região promotora do TNF- α , especialmente a troca de uma guanina por uma adenina nas posições -238 e -308 estão relacionados à alta produção de TNF- α e risco aumentado para psoríase nas populações caucasóides e não em asiáticos. Com o objetivo de determinar se polimorfismos destes genes podem ser fatores de risco para susceptibilidade ou gravidade da doença em pacientes brasileiros, foi realizado um estudo caso-controle com 69 pacientes com psoríase de início até 40 anos, com acompanhamento por dez anos para caracterização de sua evolução clínica em doença leve (grupo I) e grave (grupo II), e 70 indivíduos saudáveis. Foi feita a identificação dos alelos HLA classe I e II e SNPs da região promotora do TNF- α -238 e -308. Coletaram-se 10 mL de sangue periférico dos indivíduos e se realizou a extração do DNA através do método *salting out*. O DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com *primers* sequência-específica. As frequências alélicas e gênicas foram estimadas por contagem direta e a comparação entre as frequências dos grupos foi efetuada por Teste de Fisher (programa GraphPad InStat 3.05). Dois métodos computacionais foram usados para determinar os haplótipos dos indivíduos: (1) o algoritmo ELB implementado pelo software Arlequin 3.1 e (2) um método de base coalescente implementado pelo software PHASE v2, e as frequências de cada haplótipo foram comparadas por Teste de Fisher. No grupo II, observou-se maior associação com fatores desencadeantes como estresse, início na adolescência e predominância do sexo masculino. Pode-se sugerir que os alelos HLA-B*37, -Cw*06, -Cw*12 e -DRB1*07 foram associados ao curso mais grave da doença, enquanto -B*57 à doença mais leve. O alelo DRB1*04 teve tendência a associação negativa. Ao se comparar o grupo I com o grupo II, o alelo HLA-B*37 pode ser interpretado como fator de mau prognóstico. Não houve diferença estatística entre polimorfismos da região promotora do TNF- α entre pacientes e controles. Este estudo apontou uma alta frequência do genótipo TNF- α -238 G/G (OR 3,21; CI:1,06–9,71; $p=0,04$), assim como do alelo -238 G, no grupo com doença mais grave e, ao contrário, o genótipo -238 G/A com frequência maior no grupo de boa evolução. O haplótipo -238A-308G mostrou

frequência reduzida conferindo um efeito protetor. Estes dados não correspondem ao reportado para as populações caucasianas, considerando que a população brasileira é miscigenada. Polimorfismos dos SNPs do TNF- α não parecem ser um fator de susceptibilidade genética mais importante do que o já conhecido HLA-Cw*06 em pacientes brasileiros, mas podem ter relação com as manifestações e evolução da doença.

ABSTRACT

Psoriasis is an erythematous, scaly inflammatory dermatosis with a complex immunologic basis. The strongest genetic marker for psoriasis is HLA-Cw*06. Polymorphisms in the TNF- α promoter region, especially replacement of guanine with adenine in positions -238 and -308 are related to higher TNF- α production and higher risk for psoriasis in Caucasoid populations, not found in Asians. We did a case-control study of 69 patients with psoriasis type I and 70 controls, characterized clinical progression along 10-years of follow-up in mild or severe disease and determined HLA class I, II and TNF- α SNPs -238 and -308 polymorphisms to demonstrate whether these polymorphisms may be genetic risk for susceptibility to psoriasis or severity of the disease in Brazilians. Peripheral blood (10 ml) was collected. Genomic DNA from both psoriasis patients and controls was isolated using a salting out procedure. Polymorphisms were identified by PCR/SSP. Alleles and genotypes frequencies were compared by Fisher's test (GraphPad InStat 3.05 software). Two computational methods were used to determine the haplotypes of each subject, without taking into account any prior information: (1) the ELB algorithm implemented by the ARLEQUIN 3.1 software and (2) a coalescence based method as implemented by the PHASE v2 software. The haplotype frequencies were compared between group pairs by Fisher's test. Severe disease was found more frequently in male patients, associated with environmental factors and onset at adolescence. It may be suggested that alleles HLA-B*37, -Cw*06, -Cw*12 and -DRB1*07 were associated with severe disease course, while -B*57 with mild disease. No statistical difference was found between the patients and controls regarding polymorphisms frequencies in TNF SNPs. This study pointed to a higher TNF-238 G/G genotype frequency (OR 3,21; CI:1,06–9,71; $p=0,04$) in the group with severe disease and -238A-308G haplotype was found in reduced frequencies revealing a protective effect. These data do not correspond to those reported for the Caucasian population, considering that Brazilian population is admixed, and this is the first consideration about TNF- α SNPs in psoriasis in this population. Polymorphisms in the TNF- α SNPs do not seem to be a more important genetic risk factor for psoriasis than the already known Cw*06 in Brazilian patients, but these markers may be related to clinical manifestations.

LISTA DE ABREVIATURAS

HLA	Antígeno leucocitário humano, do inglês <i>Human Leucocyte Antigen</i>
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i> , abreviação consagrada empregada ao longo do texto
PASI	Índice de atividade e gravidade da psoríase, do inglês <i>Psoriasis Activity and Severity Index</i>
PUVA	Psoraleno associado com exposição à radiação ultravioleta A, empregado no tratamento da psoríase
PCR	Reação de polimerase em cadeia, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
OR	Odds ratio ou razão de probabilidades
IC	Intervalo de confiança
TGF- α	Fator transformador de crescimento, do inglês <i>Transforming Growth Factor- alpha</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês <i>Vascular Endothelial Growing Factor</i>
IL	Interleucina
ICAM	Molécula de adesão intercelular, do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecules</i>
CD45RO+	Receptor de célula T com marcador 45RO
NK	Células T citotóxicas com marcador NK, do inglês <i>Natural Killer</i>
PSORS	Genes de susceptibilidade à psoríase, do inglês <i>Psoriasis Susceptibility Gene</i>
HSP70	Proteína do choque térmico, do inglês <i>Hot Shock</i>

Protein

LMP Proteossomo

TAP Transportador do antígeno processado

APC Célula apresentadora de antígenos, do inglês

Antigen Presenting Cell

TCR Receptor de células T, do inglês *T Cell Receptor*

STR Repetições consecutivas de uma sequência de nucleotídeos no DNA que se repetem uma após a outra ou microssatélites, do inglês *Short Tandem Repeats*

PCR/SSP Reação de polimerase em cadeia/ *Primer Sequência-Específica*, do inglês *Specific Sequence Primer*

TBE Solução tampão com Tris/HCl, EDTA e ácido bórico, utilizado na eletroforese em gel de poliacrilamida

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Prevalência da psoríase em várias populações.....	33
Tabela 2 Exemplos de doenças associadas ao HLA.....	49
Tabela 3 <i>Loci</i> de susceptibilidade à psoríase	52
Tabela 4 Número de alelos dos genes HLA clássicos.....	53
Tabela 5 Efeitos do TNF- α nas células.....	58
Tabela 6 Características clínicas e evolução do grupo total de pacientes com psoríase.....	197
Tabela 7 Concentrações dos reagentes utilizados para a amplificação dos alelos HLA classe I e II.....	83
Tabela 8 Perfil de ciclagem do termociclador para reação de amplificação dos alelos HLA classe I e II.....	83
Tabela 9 Iniciadores para detecção dos SNPs -238 e -308 do gene do TNF- α	89
Tabela 10 Concentrações dos reagentes utilizados para a amplificação de SNPs do TNF- α -238 e -308.....	90
Tabela 11 Perfil de ciclagem do termociclador para reação de amplificação dos SNPs do TNF- α -238 e -308.....	92
Tabela 12 Características clínicas dos pacientes com psoríase de início até 40 anos no grupo I (GI) e II (GII) e frequência (%) do evento em cada grupo.....	92
Tabela 13 Outras manifestações clínicas dos pacientes com psoríase de início até 40 anos no grupo I (GI) e II (GII) e frequência (%) do evento em cada grupo.....	93
Tabela 14 Distribuição das frequências (%) dos alelos HLA-A, -B, -Cw nos pacientes com psoríase e no grupo-controle de indivíduos sadios.....	111

Tabela 15	Distribuição das frequências (%) dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 nos pacientes com psoríase e no grupo-controle de indivíduos sadios.....	112
Tabela 16	Frequências alélicas (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I e II no grupo de pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	113
Tabela 17	Frequências alélicas (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I e II no GI X grupo-controle de indivíduos sadios, GII X grupo-controle de indivíduos sadios e GI X GII.....	115
Tabela 18	Características clínicas dos pacientes agrupadas de acordo com o genótipo dos SNPs do TNF- α -238 e -308 e frequência (%) do evento em cada grupo.....	117
Tabela 19	Distribuição dos alelos G e A e frequências dos genótipos GG e GA dos SNPs do TNF- α -238 e -308 dos pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	118
Tabela 20	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do TNF- α -238 e -308 entre GI e GII e significância estatística.....	120
Tabela 21	Distribuição dos haplótipos TNF- α -238 e -308 e frequência haplotípica (%) entre grupo total, GI e GII de pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	121
Tabela 22	Populações estudadas para HLA classe I e II e relação com psoríase ($p < 0.05$) (anexo 2).....	186
Tabela 23	Populações estudadas para HLA classe I e II e relação com psoríase tipo I ($p < 0.05$) (anexo 2).....	187
Tabela 24	Populações estudadas para HLA classe I e II e relação com psoríase tipo II ($p < 0.05$) (anexo 2).....	188
Tabela 25	Populações estudadas para HLA classe I e II e alelos protetivos contra psoríase ($p < 0.05$) (anexo 2).....	188

Tabela 26	Relação dos resultados dos HLA classe I e II e dos SNPs -238 e -308 do TNF- α dos pacientes com psoríase (apêndice 4).....	202
Tabela 27	Relação dos resultados dos HLA classe I e II e dos SNPs -238 e -308 do TNF- α do grupo-controle de indivíduos sadios (apêndice 4).....	202
Tabela 28	Reconstrução haplotípica dos pacientes com psoríase considerando os genótipos TNF- α -238 G/A e -308G/A (apêndice 4).....	205
Tabela 29	Reconstituição haplotípica dos indivíduos sadios do grupo-controle considerando os genótipos TNF- α -238 e -308 (apêndice 4).....	207

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Esquema representativo da resposta imune na psoríase.. 47
Figura 2	Mapa simplificado da região HLA..... 51
Figura 3	Esquema representativo simplificado do cromossomo 6 53
Figura 4	Esquema representativo das moléculas HLA classe I e II. 55
Figura 5	Esquema representativo da apresentação de peptídeos... 57
Figura 6	Mapa simplificado dos genes do TNF- α 60
Figura 7	Esquema representativo da reação de PCR..... 88

LISTA DE IMAGENS

	Página
Imagem 1 Lesão da psoríase e Fenômeno de Koebner.....	63
Imagem 2 Psoríase vulgar.....	63
Imagem 3 Psoríase gutata.....	63
Imagem 4 Eritrodermia psoriática.....	65
Imagem 5 Psoríase pustulosa.....	65
Imagem 6 Artrite psoriática.....	65
Imagem 7 Manifestações da psoríase.....	67
Imagem 8 Língua geográfica.....	69
Imagem 9 Psoríase infantil.....	69
Imagem 10 Aspectos histológicos da psoríase.....	71
Imagem 11 Microabscesso de Munro e Pústula espongiforme.....	71
Imagem 12 Extração do DNA.....	99
Imagem 13 Preparação da PCR/SSP (HLA).....	99
Imagem 14 Gel de agarose 2% mostrando a mobilidade eletroforética dos polimorfismos da classe I.....	101
Imagem 15 Preparação da PCR/SSP (SNPs -238 e -308 do TNF- α)...	103
Imagem 16 Preparação para eletroforese em gel de poliacrilamida..	103
Imagem 17 Montagem da eletroforese.....	105
Imagem 18 Coloração com nitrato de prata e visualização dos resultados.....	105
Imagem 19 Gel de poliacrilamida 10% mostrando a mobilidade eletroforética dos polimorfismos do SNP - 308 do TNF- α .	107

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1	Frequências alélicas dos HLA classe I e II dos pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	114
Gráfico 2	Frequências alélicas dos HLA classe I e II do grupo I (GI) e grupo-controle de indivíduos sadios.....	116
Gráfico 3	Frequências alélicas dos HLA classe I e II do grupo II (GII) e grupo-controle de indivíduos sadios.....	116
Gráfico 4	Frequências dos genótipos do SNP -238 do TNF- α do grupo total de pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	119
Gráfico 5	Frequências dos genótipos do SNP -308 do TNF- α do grupo total de pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.....	119

Página

Resumo	xi
Abstract	xiv
Lista de abreviaturas	xvi
Lista de tabelas	xix
Lista de figuras	xxii
Lista de imagens	xxiii
Lista de gráficos	xxiv
1. Introdução	29
1.1. Psoríase, a doença.....	31
1.1.1. Epidemiologia no mundo e no Brasil.....	32
1.1.2. Apresentações clínicas: uma dermatose de múltiplas facetas.....	33
1.1.3. Classificação.....	34
1.1.3.1. Psoríase vulgar.....	35
1.1.3.2. Psoríase gutata.....	35
1.1.3.3. Psoríase eritrodérmica.....	35
1.1.3.4. Psoríase pustulosa.....	36
1.1.3.5. Psoríase artropática.....	37
1.1.3.6. Outras manifestações clínicas.....	38
1.1.3.7. Lesões mucosas.....	39
1.1.4. Complicações.....	39
1.1.5. Morbidades associadas à psoríase.....	40
1.1.6. Histopatologia.....	41
1.2. Patogênese.....	43
1.2.1. Alteração da queratinização.....	43
1.2.2. Alterações vasculares.....	44
1.2.3. Alterações imunológicas.....	44
1.3 As bases genéticas para o desenvolvimento da doença.....	48

1.3.1. Os genes de susceptibilidade relacionados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade.....	49
1.3.2. Genes de susceptibilidade à psoríase não ligados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade.....	52
1.4. O Complexo Principal de Histocompatibilidade.....	52
1.4.1. Características das moléculas MHC classe I e II.....	54
1.4.2. Funções biológicas do sistema HLA.....	56
1.5. O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α).....	58
1.5.1. Os genes ligados ao TNF- α	58
1.5.2. Polimorfismos da região promotora do TNF- α (-238A/G e 308A/G) e psoríase.....	60
2. Objetivos.....	73
2.1 Objetivo geral.....	75
2.2. Objetivos específicos.....	75
3. Material e métodos.....	78
3.1. Casuística.....	79
3.1.1. População de referência.....	79
3.1.2. População de estudo.....	79
3.1.3. Critérios de inclusão.....	80
3.1.4. Critérios de exclusão.....	81
3.1.5. População controle.....	81
3.2. Características do grupo de pacientes.....	81
3.2.1. Grupo I.....	81
3.2.2. Grupo II.....	82
3.2.3. Manifestações clínicas da doença.....	83
3.3. Tipificação do HLA classe I e II.....	85
3.3.1. Caracterização do ensaio.....	86
3.3.2. Coleta de material.....	86
3.3.3. Extração do DNA.....	86
3.3.4. Reação de PCR com <i>primers</i> sequência-específica (PCR/SSP) para HLA classe I e II.....	87

3.3.5. Análise do produto amplificado em gel de agarose.....	90
3.3.6. Fotodocumentação e interpretação dos resultados.....	91
3.4. Tipificação dos SNPs do TNF- α -238 e -308.....	91
3.4.1. Reação em cadeia da polimerase com <i>primers</i> sequência-específica (PCR/SSP) para SNPs do TNF- α	91
3.4.2. Análise do produto amplificado em gel de poliacrilamida.....	93
3.4.3. Visualização e interpretação dos resultados.....	94
3.5. Análise estatística.....	94
3.5.1. Tamanho amostral.....	94
3.5.2. Frequências alélicas e gênicas dos HLA classe I e II e dos SNPs do TNF- α -238 e -308.....	95
3.5.3. Métodos computacionais para reconstrução de haplótipos.....	97
4. Resultados	109
4.1. Pacientes e controles.....	111
4.2. HLA classe I e II.....	111
4.3. HLA e psoríase linear.....	117
4.4. Região promotora do TNF- α (SNPs -238 e -308).....	117
4.5. Reconstrução do haplótipo estendido TNF- α -238/-308.....	120
5. Discussão	123
5.1. Indivíduos participantes da pesquisa.....	125
5.2. Manifestações clínicas da psoríase e evolução da doença.....	125
5.3. Psoríase linear.....	128
5.4. Alelos HLA classe I e II.....	129
5.5. SNPs do TNF- α -238 e -308.....	132
5.6. Biomarcadores, aplicação para os alelos HLA e SNPs do TNF- α	135
5.7. Influência dos fatores ambientais.....	136
5.8. Interface entre fatores determinantes genéticos e desencadeantes ambientais.....	141
5.9. Considerações finais.....	143
6. Conclusões	145
7. Referências Bibliográficas	149

8. Anexos.....	183
8.1. Anexo 1: PASI.....	185
8.2. Anexo 2: Tabelas de HLA estudados nas diversas populações....	186
9. Apêndices.....	189
9.1. Apêndice 1: Termo de consentimento livre e informativo e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP.....	193
9.2. Apêndice 2: Tabela 6.....	197
9.3. Apêndice 3: Reagentes e soluções.....	199
9.4. Apêndice 4: Tabelas dos resultados.....	202
9.5. Apêndice 5: Artigos enviados para publicação e artigos publicados em periódicos e anais de congressos.....	209

1 – INTRODUÇÃO

O progresso na genética molecular permite a identificação de genes de susceptibilidade ou resistência a doenças e estudos genéticos possibilitam o desenvolvimento de modelos animais que permitem reproduzir enfermidades e testar novas drogas. A elucidação do papel do sistema imunológico leva a estratégias para desenvolvimento de novas terapias. A pele tem um histórico na identificação de genes causadores de doença, como o neurofibromatose, xeroderma pigmentoso, epidermólise bolhosa simples e a hiperqueratose epidermolítica.

A psoríase compromete sobremaneira a qualidade de vida do indivíduo e o convívio social, além do impacto socioeconômico importante devido ao gasto de milhões de dólares ao ano em hospitalizações, consultas ambulatoriais e medicamentos (1). É considerada de etiologia multifatorial, com envolvimento de vários genes e de fatores ambientais, levando à desregulação do sistema imunológico.

Houve mudança significativa na compreensão de sua patogênese. Inicialmente interpretada como uma doença primária dos queratinócitos da epiderme, posteriormente foi reconhecido que componentes da resposta imune adaptativa, os linfócitos T e citocinas derivadas da resposta Th1 eram importantes no direcionamento da proliferação dos queratinócitos. Linfócitos com marcadores CD8 residem predominantemente na epiderme promovendo ligação entre HLA classe I e psoríase (2). Os principais responsáveis pelas lesões são citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , determinantes na patogênese da doença em indivíduos geneticamente predispostos (3, 4). Estes fatores motivaram a realização deste trabalho.

1.1 - Psoríase, a doença

A psoríase é uma dermatose inflamatória eritemato-escamosa, de evolução crônica, com períodos de exacerbação e remissão (5). O termo deriva do grego *psora* que significa 'coçar', 'erupção' (aspas do autor). Há descrições desde Hipócrates (Grécia Antiga, 460-377 a.C.) e Cornelius Celsus (Roma Antiga, século I). Na Idade Média, as doenças da pele eram conhecidas como *lepra*, até que os

gregos introduziram este termo para condições descamantes e *psora* para condições pruriginosas. Robert Willan, dermatologista inglês (1757-1812), baseado no aspecto clínico, criou duas categorias de lesões cutâneas: *leprosa graecorum* para as condições com escamas e *psora leprosa* para as condições eruptivas. Em 1841, Ferdinand Ritter von Hebra, dermatologista austríaco (1816-1880), deu o nome de *psoriasis* à doença e a descreveu, em seu tratado, como é conhecida até a atualidade. O caráter hereditário da doença já foi destacado nesta ocasião (6, 7).

Os grandes estudos populacionais que permitiram conhecer a história natural da doença são de meados do século XX. Lomholt *apud* Griffiths et al. (8), escreveu sobre sua epidemiologia em Faroe Islands, arquipélago do mar da Noruega, onde a incidência da doença é alta, e Farber e Nall (9), publicaram um estudo de 5.600 pacientes sobre a população americana.

1.1.1 - Epidemiologia no mundo e no Brasil

A etnia e o clima influenciam a ocorrência da doença, visto que as maiores prevalências localizam-se nas populações geograficamente mais afastadas dos trópicos. Bell et al. (10), na população americana, estabeleceram uma estimativa de incidência de casos novos: 60 indivíduos por 100.000 por ano.

A doença é considerada comum no mundo todo com frequências diferentes nos grupos étnicos, variando de 0 a 11,8%, embora estudos de prevalência sejam de difícil interpretação, pois os critérios diagnósticos e a metodologia aplicada são diversos. Entretanto, considerando estudos populacionais, a prevalência é em torno de 0,2 a 4,8% (tabela 1). As maiores taxas estão nos países nórdicos como Noruega e Dinamarca, assim como nas Ilhas Faroe do mar do Norte, sendo a média no nordeste europeu de 2%. Nos Estados Unidos da América (EUA), é em torno de 2,2 a 2,6%. A prevalência é baixa em asiáticos, 0,3 a 1,2%, segundo diferentes estudos. Nas populações da África Ocidental, a média é de 0,3%, enquanto, na África Oriental, é de 2%. Isso explica a diferença de incidência nos EUA, em afroamericanos (1,3%) e brancos (2,5%). Nas Ilhas Samoa, nos índios latinoamericanos e nos esquimós, a doença não é relatada (11).

Tabela 1: Prevalência da psoríase em várias populações.

População/Localidade	Psoríase (% indivíduos afetados)
Ilhas Samoa	0
Índios sul-americanos	0
China	0.2 – 1.2
Croácia	1,6
Suécia	1.4
Reino Unido	1.5
EUA (caucasóides)	0.5 – 2.5
Dinamarca	2,9
Ilhas Faroe	2,8
Noruega	1.4 – 4.8

Adaptado de Gudjonsson e Elder (11).

No Brasil, não existem estudos de prevalência em grandes séries, mas dados de 2006 do Censo da Sociedade Brasileira de Dermatologia revelam prevalência estimada de três milhões de pessoas, perfazendo 1,6% da população brasileira e 2,5% dos casos atendidos em serviços de dermatologia¹ (12).

Alguns estudos demonstram discreta predominância no sexo feminino em relação ao masculino na infância, mas não há evidência de que a doença tenha incidência ou fenótipos diferentes entre os sexos. Pode iniciar em qualquer idade. Henseler e Christophers (13) relataram uma distribuição bimodal da idade de aparecimento da doença: um pico entre 16 e 22 anos e outro entre 57 e 60 anos.

1.1.2 - Apresentações clínicas: uma dermatose de múltiplas facetas

As lesões são típicas, manchas ou placas, às vezes infiltradas, eritemato-escamosas, de limites nítidos, recobertas por escamas lamelares e prateadas. Podem ser puntuadas ou foliculares, lenticulares ou em gotas, numulares, anulares, serpiginosas, placas de diversos tamanhos e, às vezes, várias formas coexistem no mesmo indivíduo. Localizam-se em qualquer local do tegumento, inclusive mucosas, sendo preferenciais as superfícies extensoras como cotovelos, joelhos, região lombo-sacral e couro cabeludo (5,6).

O diagnóstico é clínico e habitualmente fácil, mas pode ser necessário comprová-lo através da curetagem metódica de Brocq (imagem 1A, página 63).

¹ <http://www.sbd.org.br>

Esta manobra consiste na raspagem da lesão com uma cureta ou lâmina, destacando sucessivas camadas de escamas (sinal da vela), até atingir uma última camada epidérmica (membrana de Dunkan e Bulckley), que, quando removida, deixa superfície brilhante onde surgem gotículas de sangue (sinal do orvalho hemorrágico ou sangrante de Auspitz) (6). Pode ser notado, ao redor da lesão psoriática, um halo pálido por constrição vascular, chamado anel de Woronoff (14).

O fenômeno isomórfico ou de Koebner é uma característica da psoríase e consiste na reprodução de lesões psoriáticas nos locais submetidos a traumas físicos e químicos em área de pele previamente sã, segundo reação descrita por Koebner em 1878 (imagem 1B e 1C, página 63) (15, 16).

1.1.3 - Classificação

Willan caracterizou as várias apresentações da psoríase: *guttata*, *diffusa*, *palmaria* e *inveterate*, segundo relato de Bateman em 1819 (17). Atualmente, a classificação é semelhante: vulgar, gutata, eritrodérmica, pustulosa e artropática (8).

Henseler e Christophers (13), analisando a idade de aparecimento da doença em um grupo de mais de 2.000 pacientes, descreveram dois tipos de psoríase:

- tipo I: surge, em média, aos 16 anos nas mulheres e 22 anos nos homens, maior tendência a curso irregular e à generalização e associação ao alelo HLA-Cw6 em 85,3% dos casos;
- tipo II: surge por volta de 60 anos nas mulheres e 57 anos nos homens, menos associação familiar e é relacionada com HLA-Cw6 em 14,7% dos casos.

De acordo com a constituição das placas, as lesões podem ser classificadas em finas (em inglês, *thin*) ou espessas (em inglês, *thick*). As lesões espessas são associadas ao sexo masculino e doença grave, sendo que esta informação pode até mesmo orientar o tratamento (18, 19).

1.1.3.1 - Psoríase vulgar

É a forma clínica mais comum, observada em 90% dos casos, considerada estável e crônica. As lesões são placas eritemato-descamativas bem delimitadas, localizadas nas superfícies extensoras, principalmente dos joelhos e cotovelos, região umbilical, sacral e glútea, além das pernas e braços (imagem 2, página 63). O couro cabeludo é frequentemente afetado (20). Os principais diagnósticos diferenciais devem ser feitos com eczema numular, dermatofitose, dermatite seborreica e lúpus eritematoso (21).

1.1.3.2 - Psoríase gutata

Corresponde à erupção de lesões pequenas e múltiplas em todo o corpo, mais vista em crianças e adultos jovens, principalmente após surto de infecção estreptocócica das vias aéreas superiores. São lesões de dois a dez milímetros de diâmetro, arredondadas ou ovaladas, predominando no tronco e raiz dos membros, face, couro cabeludo, poupando as palmas e plantas (imagem 3, página 63) (6). Segundo Ingram *apud* Griffiths et al. (8), esta forma foi encontrada em 1,9% dos pacientes com psoríase. Diagnósticos que devem ser afastados são líquen plano, pitíriase rósea, pitíriase rubra pilar e sífilis secundária (21).

1.1.3.3 - Psoríase eritrodérmica

As lesões disseminam ocupando quase toda a superfície cutânea, com um caráter esfoliativo (imagem 4, página 65). As características da psoríase se mantêm, normalmente com bom prognóstico.

Há outra forma de eritrodermia, na psoríase instável, que pode ocorrer repentinamente, às vezes associado a terapias intempestivas, intolerância aos tratamentos tópicos ou à radiação ultravioleta (UV). Pode ser precipitada por infecções, hipocalcemia, antimaláricos, derivados de alcatrão e, classicamente, pelos corticóides sistêmicos. Há comprometimento do estado geral e febre (22). O curso é prolongado com recaídas e risco de morte por alterações do equilíbrio hidroeletrólítico e sepse. Diagnósticos diferenciais a serem considerados são as

outras causas de eritrodermia, como reação a drogas, micose fungóide, ictioses e dermatite atópica (21).

1.1.3.4 - Psoríase pustulosa

A psoríase pustulosa pode ser clinicamente evidente ou notada no aspecto histopatológico, sendo as pústulas estéreis. Apresenta-se pustulosa desde o início ou se torna pustulosa ao longo de sua evolução.

A forma localizada nas extremidades ou de Barber, descrita em 1930, revela-se por áreas eritemato-descamativas, de limites nítidos, na região palmo-plantar e contorno dos dedos, sendo que a pustulose evolui deixando escamo-crostas amareladas (imagem 5A, página 65) (6).

A psoríase pustulosa generalizada pode apresentar fases isoladas ou sucessivas. A forma de Zumbusch é aguda, com febre, mal-estar, anorexia e emagrecimento. Extensas áreas de pele inflamada recobrem-se de pústulas, que coalescem deixando escamo-crostas amareladas (imagem 5B, página 65). Há prurido, dor e manifestações articulares, como poliartrite inflamatória, em 20 a 40% dos casos. É considerada forma grave e potencialmente fatal (23).

Fatores precipitantes podem levar às formas pustulosas, como terapias tópicas com coaltar e ditranol, sendo que o caso descrito por Von Zumbusch em 1910 ocorreu desta forma, também infecções, gravidez e hipocalcemia associado ao hipoparatiroidismo. Salicilatos, iodeto, lítio, fenilbutazona, progesterona e terbinafina são drogas já relatadas como sendo desencadeantes da forma pustulosa. O maior agente precipitante é o corticóide sistêmico, embora terapias tópicas com corticóide de alta potência tenham sido implicadas (24, 25, 26). Na evolução, em alguns dias ou semanas, ocorre a remissão do quadro, a psoríase retorna ao seu estado inicial ou se mantém em eritrodermia, sendo frequente a recaída. Deve-se fazer o diagnóstico diferencial com outras pustuloses generalizadas como pustulose exantemática generalizada aguda e pustulose subcórnea (21).

1.1.3.5 - Psoríase artropática

Consiste em uma forma de artrite inflamatória, associada ou não a lesões psoriáticas da pele, com fatores reumatóides sorológicos negativos (imagem 6, página 65). A clássica artrite psoriática caracteriza-se por oligoartrite, envolvimento das articulações interfalangeanas distais, dactilite e entesite do calcâneo.

Um estudo populacional reportou prevalência de artrite psoriática de 0,02% a 0,1% (27) embora a incidência seja variável nos diversos estudos, entre 4 e 40% dos pacientes portadores de psoríase (28). Quanto mais extenso e grave o acometimento cutâneo, maior a possibilidade de artrite, o que justifica a alta associação de artrite psoriática com eritrodermia e psoríase pustulosa. Um estudo brasileiro com 106 pacientes com psoríase cutânea assinalou 24% de prevalência de alterações articulares, artralgia em 95,4%, predomínio da forma oligo ou poliarticular e alterações ungueais em todos os pacientes com artrite (29).

Não há predominância por sexo e o aparecimento costuma ser tardio, após a doença cutânea em mais de 60% dos casos. Há uma forma juvenil de artrite psoriática que tem pico de incidência em torno de 9 a 12 anos (28).

A classificação de 1973 atribuída a Moll e Wright (30), identifica didaticamente cinco subgrupos da doença, embora existam outras classificações mais práticas e recentes:

- artrite predominantemente periférica, mono ou oligoarticular assimétrica, associado à dactilite, sendo a variedade mais comum;
- predomínio de artrite interfalangeana distal;
- predomínio de poliartrite simétrica, artrite reumatóide-símile (AR-símile), sem o fator reumatóide sérico;
- artrite mutilante, incomum, acometendo dedos das mãos e hálux, com osteólise, causando encurtamento dos dedos e anquilose;
- predomínio axial, espondilite ou sacroileíte, com ou sem artrite periférica.

Alterações em outras articulações podem ocorrer, como da coluna cervical (31), com anquilose e repercussões para os nervos periféricos, articulação temporo-mandibular (32) e esternal (33).

1.1.3.6 - Outras manifestações clínicas

O acometimento ungueal é visto em todas as formas de psoríase, principalmente associado à artrite, e sua incidência é estimada em torno de 25 a 50% (34). Pacientes acima de 40 anos são mais afetados, mas é mais grave na psoríase de início precoce e familiar. As depressões cupuliformes ou ‘unha em dedal’ são alterações muito frequentes, embora possam ocorrer em outras dermatoses, como alopecia areata, e em indivíduos normais (aspas do autor) (imagem 7A, página 67). Estas alterações são atribuídas a inflamação da matriz ungueal, enquanto hiperqueratose subungueal, descoloração, onicólise e hemorragias em estilhaço são sinais de psoríase do leito da unha. Pode ocorrer destruição e eliminação rápida da lâmina (imagem 7B, página 67) (35, 36). Áreas de descoloração circulares no leito ungueal e hiponíquio são chamadas ‘gotas de óleo’ (em inglês, *oil drop*) e são alterações ungueais específicas da psoríase (36, 37) (aspas do autor).

Na face, mais visto em crianças, as lesões assumem aspecto seborreico (imagem 8, página 69). Envolvimento facial periférico é consequência da doença do couro cabeludo, enquanto lesões centro-faciais podem ser marcadoras de psoríase extensa e grave (38). A incidência destas lesões é em torno de 17 a 46% (39). No couro cabeludo, aparece como placa em áreas isoladas ou em toda a cabeça, podendo ultrapassar a implantação dos cabelos, em uma linha bem definida. Há uma forma de placa com intensa descamação esbranquiçada e aderida, que lembra fibras de amianto, vista em crianças e adultos jovens principalmente, chamada ‘pseudotinha amiantácea’ (40) (aspas do autor), que pode ser encontrada em outras dermatoses, como dermatite atópica e seborreica (41). A alopecia costuma ser não cicatricial, mas, raramente, a forma cicatricial pode acontecer. Também a eritrodermia pode levar a rarefação dos cabelos (42, 43).

A psoríase invertida ou flexural envolve as regiões axilar, inguinal, vulvar, face interna das coxas, prega glútea e outras dobras (imagem 7I e 7J, página 67).

É mais comum em idosos e imunossuprimidos e ocorre em 6,8 a 36% dos pacientes com psoríase (39).

1.1.3.7 - Lesões mucosas

De acordo com Sklavounou e Laskaris (44), Oppenheim pela primeira vez fez referência à psoríase oral em 1903. A incidência das lesões mucosas é de difícil estimativa, pois o quadro é subdiagnosticado e pouco relatado. O diagnóstico é através da concomitância de lesões cutâneas e da confirmação histopatológica (45). As maiores séries demonstraram incidência de 2 a 4% (46) e a incidência de língua geográfica nos pacientes com psoríase é de 1 a 7% (47).

O acometimento das mucosas é descrito em todas as formas clínicas, com os mais variados padrões: placas com alteração da cor da mucosa (branco, cinza, amarelo, vermelho), formas anulares e esfoliativas (48). Em geral, as lesões são inespecíficas e têm predileção pelo dorso da língua. Psoríase e língua geográfica têm aspectos histológicos semelhantes e a associação entre estas duas entidades e o alelo HLA-Cw*06 corroboram a hipótese de se tratar a língua geográfica de uma manifestação mucosa de psoríase (imagem 8, página 69) (49).

O pênis pode apresentar lesões discretas como descamação seca, geralmente no sulco balano-prepucial, até placas bem definidas no corpo do pênis e glândula (50).

O envolvimento ocular pode passar despercebido, mas blefarite, conjuntivite, queratite, xerose, simbléfaro e triquíase já foram reportados (imagem 7F, página 67) (51, 52), além da uveíte crônica em pacientes com artrite psoriática, que é uma associação bem conhecida (53).

1.1.4 - Complicações

A inflamação persistente de grandes superfícies corpóreas pode ter consequências para a termorregulação e hemodinâmica. A malabsorção intestinal pode acompanhar o quadro cutâneo e se recupera à medida em que a pele melhora. A principal perda é proteica devido à esfoliação da queratina e, nas formas abruptas, também pela perda intestinal. Desidratação é complicação

frequente devido à perda transepidérmica de água. Hipoalbuminemia pela exsudação tecidual, hipocalcemia que pode ser consequência da hipoalbuminemia, necrose tubular aguda, dano hepático, colestase, amiloidose renal, trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar, além de infecções, são exemplos de complicações (8).

Há risco de morte nas formas generalizadas. Um estudo epidemiológico retrospectivo com 99 pacientes portadores de psoríase pustulosa registrou 17% de complicações clínicas, recidivas em 42% e 2% de óbito (23). Na artrite psoriática, o óbito por doença cardio-vascular é a causa mais comum, seguido de doenças respiratórias, câncer e reações medicamentosas (54). Um levantamento de um grupo inglês (*General Practice Research Database*), que avaliou dados entre 1987 e 2002, encontrou que não há risco aumentado de morte para psoríase leve, mas sim para a doença grave, mesmo excluindo os pacientes com artropatia, sendo que os homens morrem 3,5 anos e as mulheres 4,4 anos mais cedo do que a população geral (55).

Dados americanos sobre 471 hospitalizações assinalaram 15% de mortalidade (56). Na Suécia, uma análise retrospectiva de 8.991 pacientes hospitalizados, comparados a 19.757 ambulatoriais, observou que não houve risco de óbito aumentado para os de seguimento ambulatorial, mas houve risco maior de mortalidade cardio-vascular em pacientes com internações repetidas e com idades precoces na primeira internação, o que reforça o risco aumentado para a doença grave (57).

1.1.5 - Morbidades associadas à psoríase

Henseler e Christophers (58), com dados de 40.000 pacientes, estudaram o risco esperado e calculado para as doenças associadas e encontraram aumento da incidência de doenças cardio-vasculares, hipertensão e diabetes e a menor incidência de dermatite atópica. Observaram um aumento da incidência da doença de Crohn nesta população (incidência geral é de 2% e em psoriáticos 6%). Também risco aumentado para câncer de pele não-melanoma e doenças linfoproliferativas foi observado e se discute a provável relação com tratamentos

imunossupressores e fototerapia (59, 60). Outras dermatoses autoimunes podem ser concomitantes, o que é raro, sendo que um trabalho da Croácia com 1.743 pacientes encontrou associação em menos de 1% dos casos. Penfigóide bolhoso, alopecia areata e vitiligo, respectivamente, foram as associadas (61).

Há controvérsias sobre a doença renal própria da psoríase. Amiloidose, toxicidade por drogas, como metotrexate e ciclosporina, e depósito de IgA podem comprometer o rim.

Amiloidose renal é uma rara complicação de artrite psoriática, também da forma pustulosa e não pustulosa extensa, e associa-se à rápida deterioração da função renal e mau prognóstico, o que justifica a necessidade de combate agressivo à inflamação nestes pacientes (62).

Um estudo de 11 casos de psoriáticos com alterações do sedimento urinário demonstrou 18% com diminuição da função renal, 82% com hematúria, 100% com proteinúria. A análise histopatológica do rim evidenciou glomerulonefrite mesangioproliferativa leve a moderada com depósito de IgA em 73% (63).

Há risco substancial de infarto agudo do miocárdio (IAM) em pacientes com psoríase, maior na psoríase grave que requer tratamento sistêmico e maior em jovens. Estes pacientes também apresentam risco aumentado para diabetes, hiperlipidemia, antecedente de infarto, alto índice de massa corporal e tabagismo. O risco de IAM persiste mesmo após se corrigirem todas estas variáveis, o que sugere que um estado inflamatório sistêmico predispõe à aterosclerose das coronárias, como se observa na artrite reumatóide (64, 65).

1.1.6 - Histopatologia

Os estádios iniciais mostram predominantemente alterações dérmicas, dilatação capilar e edema da derme papilar com infiltrado inflamatório linfocítico perivascular, sendo que os linfócitos se dirigem para os estratos inferiores da epiderme causando discreta espongiose (imagem 10A, página 71) (66).

Ocorrem alterações focais na porção superior da epiderme, como a vacuolização e o desaparecimento da camada granulosa, dando origem a

paraqueratose focal. Neutrófilos esparsos ou agrupados em meio à paraqueratose ou na ortoqueratose podem ser encontrados e correspondem às manifestações precoces dos microabscessos de Munro (imagem 11A, página 71) (67).

Quando há marcada exocitose de neutrófilos, que se agregam nas porções altas da camada espinhosa, formam-se as pústulas espongiformes de Kogōj (imagem 11B, página 71) (67).

Nas porções inferiores da epideme, observam-se frequentes mitoses, conferindo-lhe carácter hiperplásico. Os linfócitos também se restringem a esta região. Inicialmente tais achados são focais, mas tornam-se confluentes em toda a extensão da lesão psoriática (66).

Nas lesões completamente desenvolvidas, observa-se acantose com alongamento regular das cristas interpapilares, que se espessam na sua porção inferior, afinamento da epiderme suprapapilar com pústulas espongiformes discretas, palidez das camadas superiores da epiderme, diminuição da camada granulosa, paraqueratose confluyente, microabscessos de Munro, alongamento e edema da derme papilar e capilares dilatados e tortuosos (imagem 10B, página 71). O sinal de Auspitz corresponde à exposição destes capilares. Os achados são inespecíficos, excetuando os microabscessos de Munro, que fazem diagnóstico de psoríase (67).

A microscopia eletrônica mostra os seguintes eventos: alargamento entre as células endoteliais, com citoplasma mais rarefeito, e vênulas pós-capilares acercadas de mastócitos. Estes sofrem degranulação horas depois da migração de macrófagos ativados para os estratos inferiores da epiderme, onde há perda dos complexos de tonofilamentos dos desmossomos. Somente depois, são vistos os linfócitos e neutrófilos (67).

A ultra-estrutura do queratinócito detalha grandes anormalidades, como diminuição dos tonofilamentos, perda da agregação celular, diminuição do número e tamanho dos grânulos de querato-hialina, células corneificadas mantendo organelas e núcleo (paraqueratose). Os espaços intercelulares entre as células epidérmicas são alargados devido à insuficiência do cimento intercelular e a

adesão fica limitada aos desmossomos. Os queratinócitos são defeituosos na lesão e não apenas imaturos devido à aceleração da proliferação epidérmica (66).

1.2 - Patogênese

Os elementos principais que caracterizam a psoríase são a hiperproliferação epidérmica com perda da diferenciação, dilatação e proliferação dos vasos da derme e acúmulo de células inflamatórias, particularmente neutrófilos e linfócitos T. Fatores de crescimento, citocinas e mediadores inflamatórios mostram-se alterados na placa psoriática (68).

1.2.1 - Alteração da queratinização

A média da replicação celular epidérmica está acelerada na psoríase, o que é demonstrado pelo aumento do número de figuras de mitose nas camadas basal e suprabasal e o número aumentado de figuras pré-mitóticas. Conforme descrito em 1965 por Weinstein et al. *apud* Toussaint e Kamino (66), existe uma aceleração no tempo de trânsito entre a célula da camada basal e a camada córnea de 42 a 53 dias para sete dias. Outras evidências são de que o ciclo da célula germinativa está encurtado de 311 para 36 horas, indicando que os queratinócitos psoriáticos se proliferam oito vezes mais rápido do que o normal, além do que 100% das células germinativas da epiderme entram no processo de queratinização ao invés de 60% como ocorre na epiderme normal (69).

Durante o processo de diferenciação, os queratinócitos migram da camada basal até os estratos superiores da camada espinhosa e proteínas estruturais como a queratina são sintetizadas. Na psoríase, as queratinas K5 e K14 continuam sendo expressas nos queratinócitos basais, como na epiderme normal, mas, nas camadas superiores, as queratinas K1 e K10 são gradualmente substituídas pelas chamadas queratinas associadas à hiperproliferação K6 e K16 (70). A involucrina, uma das mais importantes proteínas precursoras do envelope das células corneificadas (71), normalmente encontrada nas camadas granulosa e córnea, passa a ser expressa na camada suprabasal (70).

O aumento da proliferação de queratinócitos é consequência de um aumento na proliferação do compartimento celular na camada basal e suprabasal da epiderme, e não apenas pelo encurtamento do ciclo celular. Vários mediadores inflamatórios envolvidos na modulação da proliferação dos queratinócitos, em particular o TGF- α (do inglês *Transforming Growth Factor*), são mediadores destes eventos (72).

1.2.2 - Alterações vasculares

Os capilares dérmicos na lesão estão dilatados, alongados e retorcidos e o endotélio da microvasculatura superficial está quatro vezes aumentado. Estas alterações ocorrem no início do desenvolvimento da lesão. Os queratinócitos epidérmicos são os iniciadores das alterações vasculares, produzindo mediadores de atividade angiogênica como interleucina 8 (IL-8) (73), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator endotelial estimulador da angiogênese e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (74). O endotélio vascular participa ativamente do processo inflamatório, através da expressão de moléculas em sua superfície envolvidas na quimiotaxia de leucócitos, induzido por mediadores inflamatórios como histamina, neuropeptídeos, IL-1 e TNF- α (75). As moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) expressas na membrana dos leucócitos e as moléculas de adesão das células endoteliais (VCAM-1) são exemplos dos mecanismos de interação entre células inflamatórias e vasos (75).

1.2.3 - Alterações imunológicas

A pele não é mais considerada apenas um órgão de barreira, mas tem complexa função imunológica, com a participação de linfócitos T e células de Langerhans CD1+ DR+, que circulam entre epiderme, derme e linfonodos regionais, além de outras células dendríticas da derme e queratinócitos produtores de citocinas imunorregulatórias (68, 76).

Segundo evidências clínicas, a psoríase é mediada por linfócitos T, pois a apresentação de antígenos está amplificada na lesão, ocorre afluxo precoce de linfócitos T nas lesões iniciais, há associação com antígenos de

histocompatibilidade e resposta a tratamentos imunossupressores como ciclosporina. Estes linfócitos T expressam marcadores especiais (CD45RO+ de memória, HLA-DR e CD25+ de ativação, e CLA, do inglês *Cutaneous Lymphocytes-associated Antigens*) (77).

Os linfócitos T são responsáveis pelo início do processo, mas não se sabe o que os torna ativados. Há estudos que mostram a implicação de antígenos convencionais infecciosos, epítomos ocultos da pele revelados após a exposição a tais antígenos e superantígenos bacterianos (78).

Os superantígenos são antígenos capazes de sofrer apresentação diretamente aos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos, sem participação de processamento intracelular ou da expressão de peptídeos (79). Swerlick et al. (80) demonstraram sequência de homologia entre a proteína do estreptococo M6 e a queratina de 50 kDa tipo I, constituinte das queratinas hiperproliferativas K16 e K17, que implica na proliferação clonal de linfócitos T contra esta bactéria, mas que pode reagir cruzadamente e reconhecer o epítomo da queratina. A apresentação dos superantígenos para os receptores V β do receptor dos linfócitos T conduz a uma expansão clonal no local. Foi constatado que, na placa de psoríase, os linfócitos T expressam regiões V β , o que leva a supor a participação dos superantígenos na sua patogênese (81, 82). Entretanto, não se evidenciou a presença destas células expressando receptores V β nas placas crônicas, do que se conclui que os superantígenos podem ser os iniciadores das lesões, mas a continuidade do processo pode ser por antígenos próprios (2, 83).

Acredita-se que, na psoríase, ocorre estimulação persistente do linfócito T, da apresentação de antígenos ou autorreatividade (84). Há demonstração de linfócitos T-auxiliares antígeno-reativos no infiltrado dérmico da placa de psoríase (85). Nikaein et al. (86) demonstraram que linhagens de linfócitos do infiltrado da lesão têm autorreatividade diretamente contra antígenos específico dos *locus* secundário de histocompatibilidade.

Os linfócitos T do infiltrado cutâneo, inicial e predominantemente, são de memória efetora CD45RO+ (87) e a maioria apresenta marcadores de antígenos

associados aos linfócitos cutâneos (CLA) (88). Estas células formam clones na epiderme da placa de psoríase. Linfócitos T NK (do inglês *Natural Killer*) e neutrófilos formam grande parte do infiltrado, particularmente nas formas pustulosas (89).

Estudos recentes têm considerado o papel das células dendríticas. Três tipos de células dendríticas estão envolvidas: as células de Langerhans da epiderme, as células dendríticas dérmicas com fator XIIIa e as células dendríticas plasmocitóides que estão presentes na derme de placas de psoríase e não na pele normal (90).

Células de Langerhans são os sentinelas mais externos do sistema imune, reconhecem e capturam o antígeno, migram para o gânglio linfático local, onde ocorre a apresentação do antígeno ao linfócito T (90, 91).

As células plasmocitóides são diferentes das demais porque expressam CD123 e HLA-DR, mas não CD11c. Após sua ativação por meio de receptores de superfície *toll-like*, estas células produzem interferon- α (IFN- α) precocemente na lesão, o que favorece a formação da placa em indivíduos predispostos, direcionando a resposta local para Th1 e fazendo uma ligação entre a resposta inata e adaptativa. O IFN- α , citocina pró-inflamatória chave na resposta imune inata, está substancialmente aumentado na psoríase e demonstrou-se que a inibição da produção ou sinalização do IFN- α bloqueia também o afluxo de linfócitos T para a lesão (92, 93).

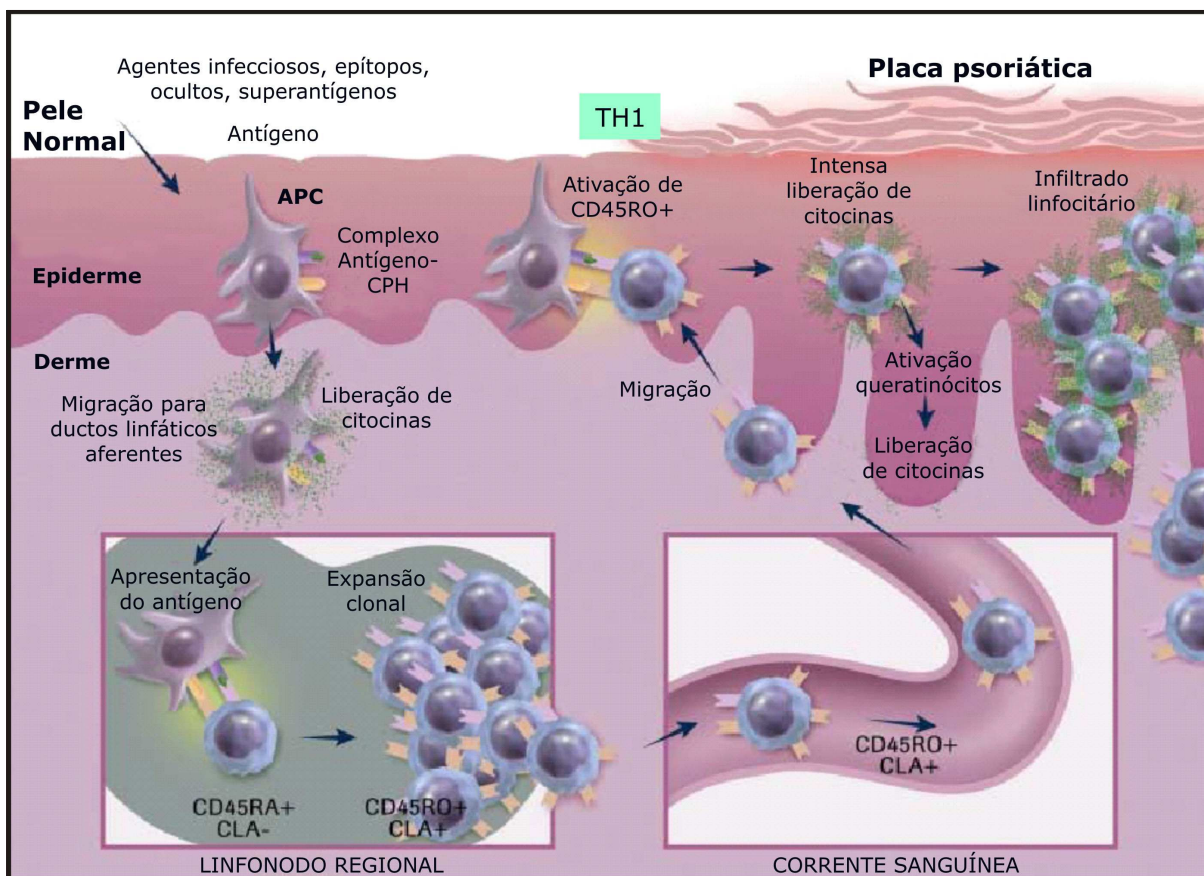


Figura 1: Esquema representativo da resposta imune na psoríase. Antígenos na epiderme são fagocitados por células de Langerhans que migram para o linfócito locorregional para promover a expansão clonal de linfócitos $CD45RO^+$. Estes linfócitos retornam à epiderme para compor o infiltrado inflamatório que interage com os queratinócitos através da produção de citocinas, levando às alterações epidérmicas da lesão psoriática. Adaptado de PRINZ et al., (94).

Existe resposta imune adaptativa mediada por células fundamentais na psoríase. A desregulação do sistema inato, com acentuada participação das células dendríticas no início, leva à 'profissionalização' da resposta imunológica (aspas do autor), através de amplificação e memória, o que leva ao desenvolvimento de uma resposta adquirida com maior participação dos linfócitos.

A resposta Th1, cujo modelo clássico é a psoríase, conta principalmente com a participação das citocinas $IFN-\gamma$, IL-2 e IL-12 e baseia-se na imunidade celular. Na resposta Th2, predominam as citocinas IL-4 e IL-10 e a imunidade humoral, sendo mais observada em doenças da infância, como nos eczemas. A resposta Th17 foi recentemente descrita e inicia-se pela produção de IL-23 e se

mantém pelas IL-17 e IL-22. Tem papel regulador das respostas e é muito estimulada na psoríase (95).

Citocinas da resposta Th1 predominam na placa psoriática, o que é consistente com a pouca associação com doenças Th2 como dermatite atópica. Há descrições de transplante de medula óssea levando à 'transmissão' (96) ou 'cura' da psoríase (97, 98, 99) (aspas do autor).

1.3 - As bases genéticas para o desenvolvimento da doença

A causa da psoríase é desconhecida. Diversos fatores influenciam no seu desencadeamento ou exacerbação: trauma físico, químico, cirúrgico, inflamatório, infecções, drogas como lítio, beta-bloqueadores e anti-inflamatórios não-hormonais, estresse, distúrbios metabólicos, endócrinos, etc. (5). Entretanto, a predisposição genética é fator determinante.

A origem genética da psoríase é aventada há mais de 100 anos, desde as descrições de Willan. Aproximadamente um terço dos pacientes relatam ao menos um parente de primeiro grau afetado. Hellgren *apud* Elder et al. (100) encontrou incidência de 6,4% entre parentes de indivíduos acometidos pela psoríase, o que corresponde a mais de três vezes a incidência da população geral.

Brandrup et al. (101) encontraram, entre gêmeos dinamarqueses, 63% de concordância em monozigóticos. A variação observada entre os indivíduos com presença ou ausência de psoríase é devida mais às suas diferenças genéticas do que às diferenças ambientais que eles experimentam em casa ou no trabalho. Farber e Nall (9) encontraram concordância de 70% em gêmeos monozigóticos e 23% em dizigóticos. O risco de um descendente ter a doença é de 41% se ambos os pais forem afetados, 14% se um dos pais for afetado e 6% se um irmão for afetado, comparado com 2% se não houver casos na família (102).

A herdabilidade é estimada por diversos estudos populacionais e de famílias e o consenso é que se trata de herança poligênica e multifatorial, isto é, com participação de fatores ambientais modificadores da expressão de vários genes (102). O mapeamento genético constitui a chave para a identificação dos genes responsáveis por doenças.

1.3.1 - Os genes de susceptibilidade relacionados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade

Várias doenças autoimunes já foram relacionadas com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH ou MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) (tabela 2).

Tabela 2: Exemplos de doenças associadas aos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA).

Doença	HLA associado
Espondilite anquilosante	B27
Diabetes mellitus tipo I	DR3+DR4
Síndrome de Goodpasture	DR2
Pênfigo vulgar	DR4
Uveíte anterior aguda	B27
Lúpus eritematoso sistêmico	DR3
Esclerose múltipla	DR2
Doença de Graves	DR3
Artrite reumatóide	DR4
Miastenia gravis	DR3

Adaptado de Pontes et al. (103).

Russel et al. (104), em 1972, demonstrou a primeira associação de HLA com psoríase e muitos estudos têm demonstrado genes associados. Nove *locus* com evidência estatística de ligação com susceptibilidade à doença foram reportados, embora outros tenham participação ainda não comprovada (105). Estes genes são chamados PSORS (do inglês *Psoriasis Susceptibility Locus*) seguido de um número.

O PSORS1 é o maior determinante genético para a psoríase, responsável por 30 a 50% da hereditariedade da doença (106), localizado dentro do MHC na região de classe I, na posição 6p21.3 (107) (figura 2).

A região contém menos de dez genes sendo que três têm sido o maior foco dos pesquisadores devido à forte associação entre polimorfismos nestas sequências e psoríase. O principal é o HLA-C (variante associada Cw6) que codifica uma proteína MHC classe I (109).

Genes igualmente localizados na região HLA, cujos produtos têm participação na patogênese da psoríase, incluem o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e beta (TNF- β) (110) e alguns autores sugerem que podem estar em desequilíbrio de ligação com o HLA-C.

Os fenótipos da doença são influenciados pela heterogeneidade genética, principalmente pelo PSORS1. A psoríase gutata é fortemente ligada a ele, enquanto a psoríase palmo-plantar pustulosa e a psoríase de surgimento tardio após 40 anos não são.

Vários alelos são descritos em associação com psoríase, como HLA-B*13, -B*37, -B*46, -B*57, -Cw*01, -Cw*06, -DR7 e -DQ9. O HLA-Cw*06 representa o maior risco relativo de associação com a doença em populações caucasóides e está em desequilíbrio de ligação com outros alelos como o -B*13. O HLA-B*27 é associado com a variedade axial da artrite psoriática (111).

É importante destacar a definição de 'ligação', que descreve a tendência de dois 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 mesma família pode ocorrer como resultado da *epistasia*, que significa interação entre diferentes genes (112).

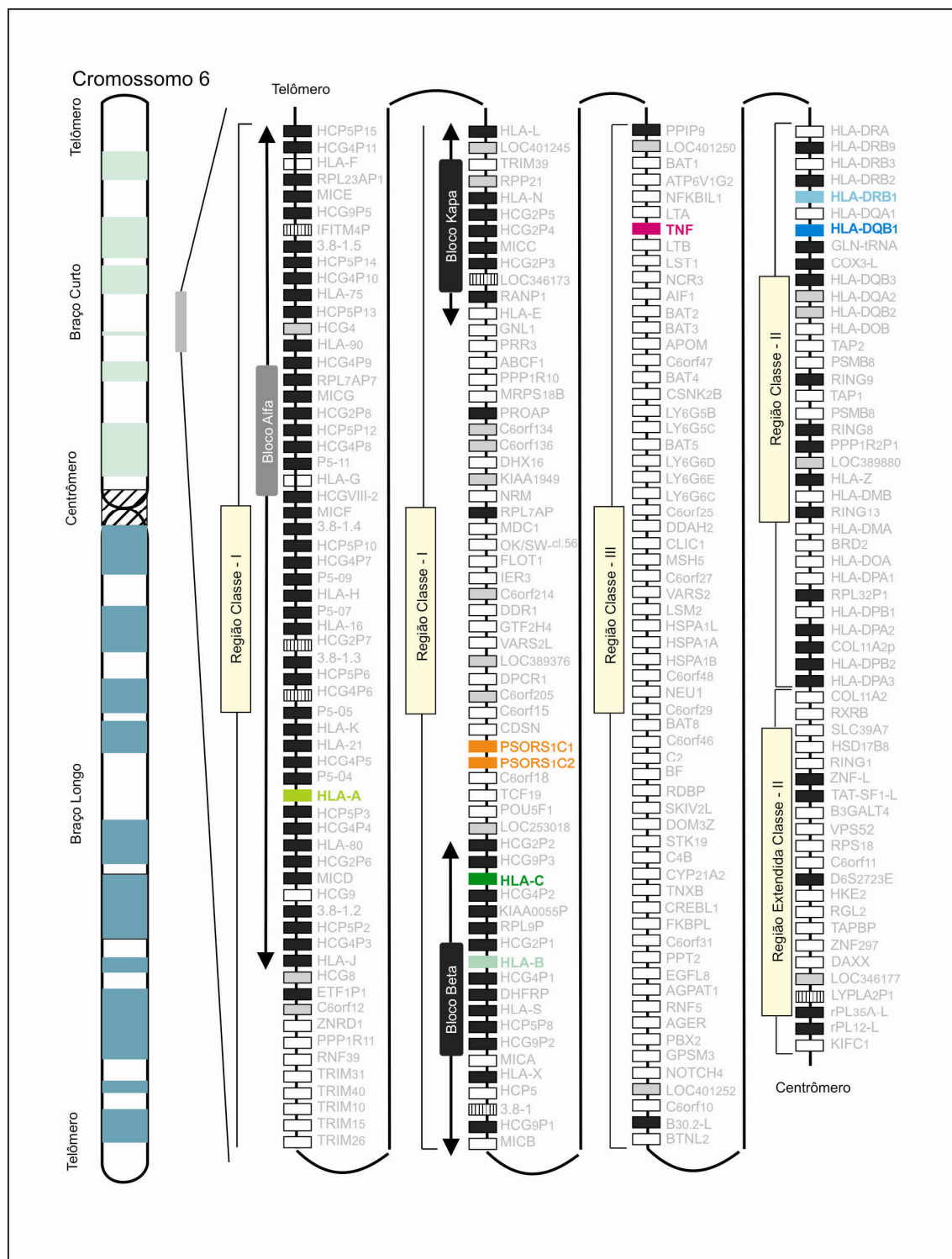


Figura 2: Mapa esquemático da região HLA. Caixas brancas, cinzas, listradas e pretas significam genes expressos, genes candidatos, genes não-codificados e pseudogenes respectivamente. Os genes associados à psoríase estão coloridos. Adaptado de Shiina et al. (108).

1.3.2 - Genes de susceptibilidade à psoríase não ligados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade

Sobre o papel do sistema HLA, é necessário salientar que:

- os alelos implicados estão em desequilíbrio de ligação, isto é, são transmitidos juntos mais frequentemente do que as possibilidades estatísticas esperadas, na população de psoriáticos em relação à população geral;
- para cada indivíduo com psoríase que carrega determinado alelo suspeito de marcador, há dez indivíduos com o mesmo alelo mas sem história da doença;
- há poucas publicações sobre famílias afetadas e há exemplos de alelos provenientes do genitor não afetado (100).

Apenas 10% das pessoas que tem HLA-Cw*06 desenvolvem psoríase. O PSORS1 é responsável por aproximadamente 50% do risco de desenvolver a doença, o que significa que outros genes podem estar implicados (100). Foram identificados 18 *loci* de susceptibilidade à psoríase fora da região MHC. O PSORS2 (17q24-q25), PSOR 5(3q21) e PSORS9 (4q28-31) foram os mais reproduzidos em vários estudos (105) e estão representados na tabela 3.

Tabela 3: *Loci* de susceptibilidade à psoríase.

Identificação do locus	Localização cromossômica	Função relacionada
PSORS 1	6p21.3	MHC
PSORS 2	17q24-q25	SLC9A3R1, NAT9 e/ou RAPTOR
PSORS 3	4q34	
PSORS 4	1q21.3	Diferenciação epidérmica
PSORS 5	3q21	SCL12A8, homólogo a transportadores de cátion cloro, sem expressão aumentada na psoríase
PSORS 6	19p13; 20p	
PSORS 7	1p	
PSORS 8	16q12-q13	CARD15, associado à doença de Crohn
PSORS 9	4q28-31	

Adaptado de Capon et al. (105).

1.4 - O Complexo Principal de Histocompatibilidade

O Complexo Principal de Histocompatibilidade constitui um conjunto de aproximadamente 200 genes que se localizam no braço curto do cromossomo 6,

estendendo-se por mais de 4.000 kilobases, com mais de 40 *loci*. É o maior complexo gênico conhecido do genoma humano. Caracteriza-se pela diversidade, polimorfismos e desequilíbrios de ligação (113), como evidencia a tabela 4.

Tabela 4: Número de alelos dos genes HLA clássicos.

Gene HLA	nº alelos	Gene HLA	nº alelos	Gene HLA	nº alelos
A	617	DRA	3	DQA1	34
B	960	DRB1	543	DQB1	87
C	335	DRB3	45	DPA1	23
E	9	DRB4	13	DPB1	127
F	21	DRB5	18		
G	28				

Adaptado de Pontes et al. (103).

Esta parte do genoma que constitui o MHC é denominada, na espécie humana, de sistema HLA (do inglês *Human Leucocyte Antigen*). O complexo HLA tem cerca de quatro milhões de pares de bases (pb), o equivalente a 0,1% do genoma humano, englobando mais de 100 genes (114).

A organização dos genes que codificam os aloantígenos HLA de classe I e II estão intimamente ligados entre si no braço curto do cromossomo 6. podendo ser subdivididos em 3 regiões: classe I, II e III (figura 3).

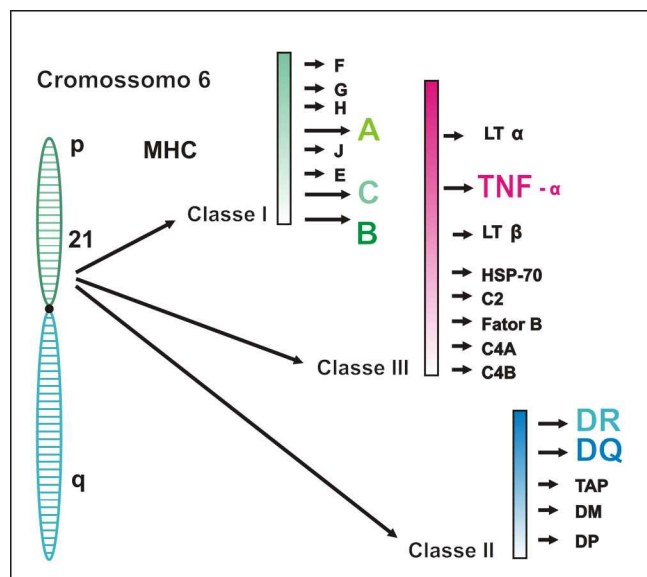


Figura 3: Esquema representativo simplificado do cromossomo 6.

Os genes da região de classe I constituem a porção mais telomérica do loco HLA e codificam os antígenos HLA-A, -B, -C. Os genes da região de classe II são os mais centroméricos 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) (115).

Cada indivíduo pode ter dois diferentes alelos para cada gene e esses alelos expressam-se concomitantemente. Isto é, cada um dos alelos codifica uma molécula de proteína do MHC diferente, que poderá ser expressa na superfície da célula. Na população, existe um grande número de alelos diferentes, resultando em alto grau de polimorfismo. 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 (116).

Os genes do MHC 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 (117). 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 (118).

1.4.1 - Características das moléculas MHC classe I e II

As moléculas de classe I, expressas praticamente em todas as células nucleadas, são formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente: a cadeia α , codificada por genes do MHC (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 *éxons* separados (119, 120). Há polimorfismo alélico

extenso dos genes HLA-A, -B, -C, localizado nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (116) (figura 4).

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 LMP2 e LMP7 (proteases 2 e 7) e são transportados via TAP 1 e 2 (transportadores 1 e 2 do processamento de antígeno) ao retículo endoplasmático e ligados às moléculas HLA classe I previamente sintetizadas. O complexo HLA-peptídeo é estável e pode ser transportado até a membrana plasmática (121, 122, 123).

As moléculas de classe II são formadas pela união não covalente de duas cadeias polimórficas, uma cadeia α de 35 kDa e uma cadeia β de 27 kDa (124, 125), codificadas por genes do MHC e expressas apenas em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cells*), como por exemplo linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células do epitélio tímico (figura 4).

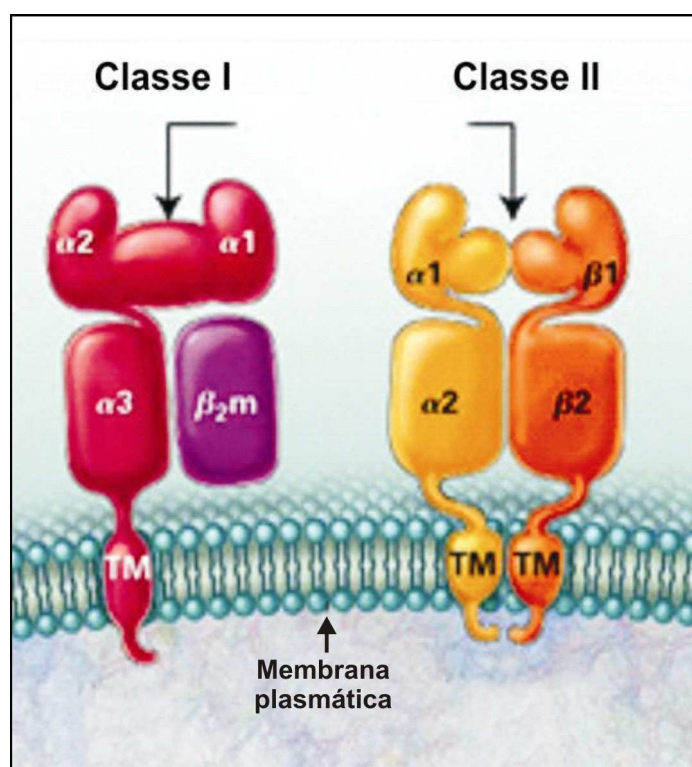


Figura 4: Esquema representativo das moléculas HLA classe I e II. Adaptado de [http:// www.e-gastroped.com.br](http://www.e-gastroped.com.br) (126).

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 MHC. Após a ligação do peptídeo, o complexo HLA-antígeno é estabilizado e transportado até a superfície celular, onde as moléculas HLA exercerão sua função de apresentação de antígenos e interação com o receptor do linfócito T (TCR). Estes receptores têm especificidade para fragmentos de peptídeos de um antígeno e de moléculas do MHC, ao qual estão ligados (127).

A natureza polimórfica das diferentes especificidades alélicas das moléculas classe I e II permite a ligação de numerosos fragmentos peptídicos (128). O polimorfismo do MHC aumenta a amplitude de antígenos que, potencialmente, podem se ligar aos antígenos classe I e II, resultando desse modo em respostas imunes mais efetivas (129).

1.4.2 - Funções biológicas do sistema HLA

Em 1958, Dausset *apud* Pontes et al., descreveu o primeiro antígeno HLA identificado por reação sorológica e Terasaki estabeleceu sua importância no transplante renal (103). Doherty e Zinkermagel (130) propuseram que a função central do MHC era relacionada à sinalização do 'próprio' e do 'não-próprio' (aspas do autor). Os antígenos de superfície celular associados ao MHC eram importantes nas interações celulares e reconheceu-se a necessidade de compatibilidade entre MHC para sucesso nos transplantes. Nos anos 80, com a descoberta de duas subpopulações de linfócitos T auxiliares e citotóxicas, dos receptores específicos de linfócitos T (TCR) e das moléculas acessórias CD4+ e CD8+, maior foi o entendimento do papel do MHC. Inferiu-se que a fenda de ligação do HLA deveria estar sempre ocupada por um peptídeo para que a molécula pudesse ser expressa estavelmente na membrana celular (103).

A função biológica das moléculas do MHC é a apresentação de antígenos processados no interior das células apresentadoras de antígenos (APCs) a linfócitos T auxiliares (Th de T *helper*) CD4+ ou citotóxicos (Tc) CD8+.

As APCs apresentam peptídeos provenientes da via endocítica de processamento, ou seja, peptídeos resultantes da degradação proteolítica de

antígenos ou organelas celulares velhas no citoplasma, através de suas moléculas de classe I para os linfócitos T CD8+. Este é o mecanismo de apresentação de antígenos virais. Também apresentam peptídeos maiores, provenientes da via exógena, resultantes da degradação proteolítica de organismos fagocitados e degradados em compartimentos celulares específicos, através de suas moléculas de classe II, para linfócitos T CD4+. É esta a via preferencial para apresentação de antígenos bacterianos. É possível haver apresentação cruzada (figura 5) (131).

A configuração da fenda depende de seu tamanho, formato e carga e é ditada basicamente pela sequência de aminoácidos que a compõem. Isso determina os tipos de peptídeos que podem se ligar a ela e sofrer apresentação ao linfócito T. O impacto biológico que o polimorfismo do sistema MHC, com seus 3.050 alelos, tem na resposta imune é fundamental (103).

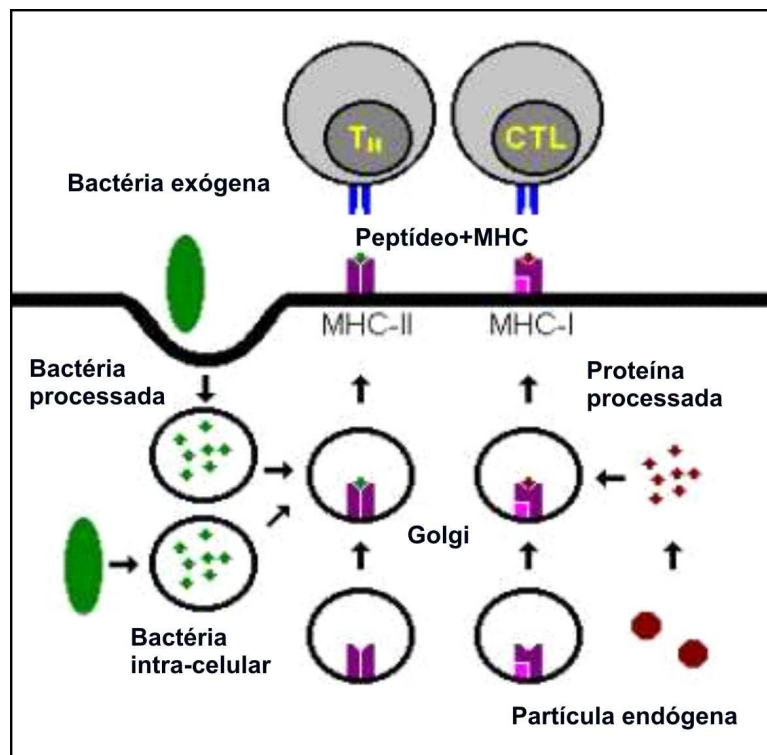


Figura 5: Esquema representativo da apresentação de peptídeos, evidenciando a via intrínseca, com a participação do MHC classe I, e extrínseca, com a participação do MHC classe II. Adaptado de Abbas e Lichtman (131).

1.5 - O Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória potente com papel importante nas respostas inflamatória e imunológica. Estimula a produção de outras citocinas, aumenta a expressão de moléculas de adesão, a ativação de neutrófilos e a produção de anticorpos. Influencia a síntese de vários componentes do tecido conectivo, estimulando a produção de collagenase, atua sobre as metaloproteinases, a angiogênese e a proliferação de fibroblastos, com importante participação no remodelamento tecidual (132) (tabela 5).

Os fagócitos mononucleares ativados (monócitos e macrófagos) são os principais produtores de TNF- α , que promove a quimiotaxia e ativação de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção e estão envolvidos nas reações inflamatórias locais. O TNF- α induz a síntese de outras citocinas inflamatórias como IL-1 e IL-8 e participa como importante regulador da resposta imune inata. Está envolvido em processos patológicos como choque térmico, doenças autoimunes e replicação viral. No caso da psoríase, o TNF- α é determinante no desenvolvimento das lesões cutâneas e articulares (4).

Tabela 5: Efeitos do TNF- α nas células.

Célula-alvo	Ação do TNF- α	Efeito
Macrófago	↑ citocina pró-inflamatória	Aumento da inflamação
Queratinócito	↑ proliferação epidérmica	Edema das articulações
Endotélio	↑ expressão de moléculas de adesão e produção de VEGF	Acantose e hiperqueratose
Hepatócito	↑ resposta da fase aguda	Aumento do afluxo de leucócitos na pele e articulações
Sinoviócito	↑ síntese de proteinase	Aumento da angiogênese e eritema
Linfócito T	↑ citocina pró-inflamatória	Aumento da proteína C-reativa
	↑ ativação do fator de transcrição nuclear	Degradação da cartilagem
	Ativação da célula T	Aumento da inflamação
Célula dendrítica	↑ citocina pró-inflamatória	Aumento da inflamação
	Maturação da célula dendrítica	
	↑ migração de célula dendrítica da pele para os nódulos linfáticos	
	Ativação e diferenciação da célula T	

Adaptado de Goffe e Cather (4).

1.5.1 - Os genes ligados ao TNF- α

O TNF- α é codificado por um gene localizado no braço curto do cromossomo 6 em humanos, na região 6p21.3, que está em sequência com o gene da linfotoxina- α (LT) na região de classe III do MHC. Localiza-se entre os

genes que codificam as moléculas do MHC de classe II, DP, DQ e DR, e as moléculas de classe I, A, B e C (figura 6) (3).

O *locus* do TNF- α possui 12 kb de comprimento, contendo várias áreas polimórficas e incluem seis microsatélites (STR, do inglês *Short Tandem Repeats*), TNFa, b, c, d, e e f. A possível associação do polimorfismo dos genes do HLA de classe I com os microsatélites marcadores no *locus* do TNF- α tem sido examinada em diferentes populações e os resultados mostram desequilíbrio de ligação entre certos alelos destes microsatélites e os *loci* HLA classe I e classe II (133, 134), o que também foi encontrado na população brasileira (135).

Substituições únicas de nucleotídeos (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms* ou SNPs) têm sido identificadas na região do TNF- α , tendo importância as localizadas na região promotora do gene, nas posições -238 e -308, relacionadas à susceptibilidade a diversas doenças. Entende-se por região promotora uma sequência de nucleotídeos que pode determinar a transcrição do gene em questão. Os SNPs são diferenças na sequência de DNA envolvendo um simples par de base, que ocorre em frequência maior que 1% da população (136).

Nestas posições é comum a presença de guanina (G). Em alguns alelos, esta posição é substituída pela adenina (A). A presença de uma adenina na posição -308, resulta em um aumento no nível de transcrição quando comparado com o alelo G (137). Em estudos com pacientes portadores de linfoma de Hodgkin, os níveis TNF- α foram maiores em pacientes com uma adenina na posição -308 (138). Em indivíduos caucasóides com lúpus eritematoso sistêmico, o alelo -308A conferiu susceptibilidade independentemente da presença do alelo HLA-DR3 (139).

Outras doenças imunológicas parecem mostrar associações entre genes HLA e TNF- α , como artrite reumatóide, espondilite anquilosante, diabetes *mellitus* insulino-dependente e esclerose múltipla.

A associação do genótipo das regiões promotoras do TNF- α -238 e -308 G/A com outras doenças em pacientes brasileiros foi observada em vários estudos, como no transtorno obsessivo-compulsivo (140), cardiomiopatia

chagásica grave (141) e hanseníase paucibacilar (142, 143). Não se encontrou associação com pênfigo foliáceo (144) e periodontite (145, 146).

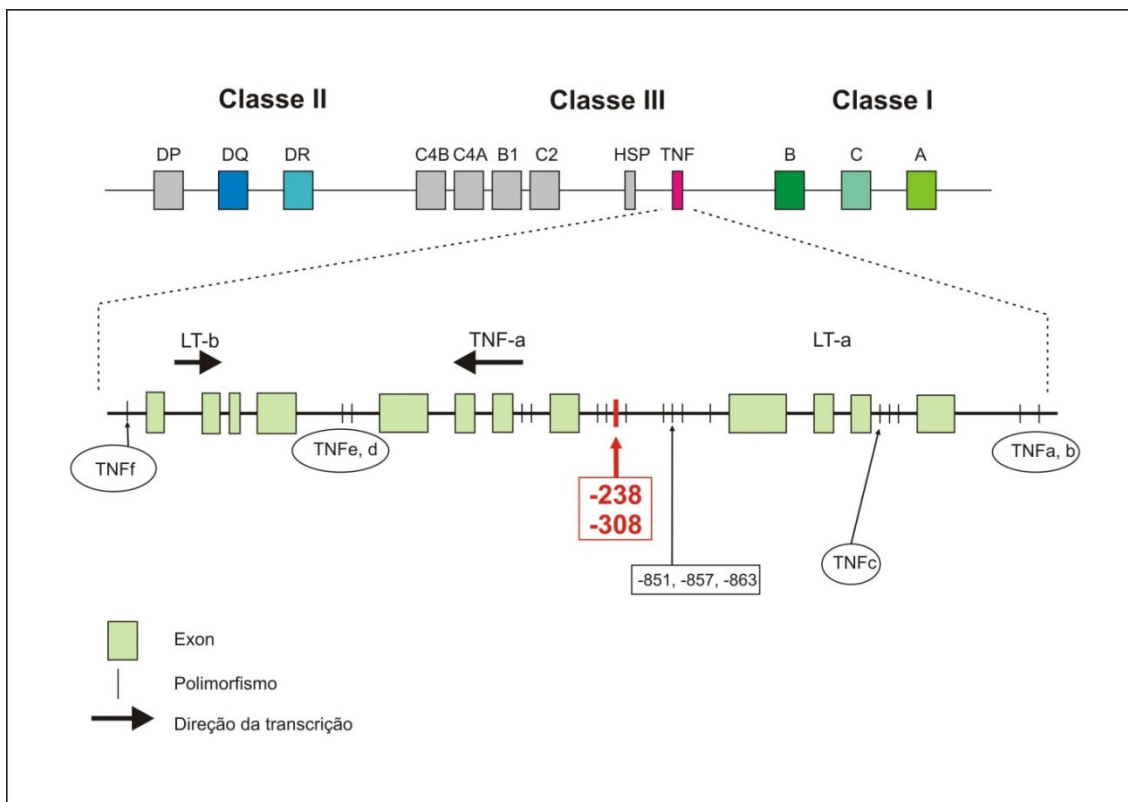


Figura 6: Mapa simplificado dos genes do TNF-α, mostrando a localização dos seis microssatélites e das regiões promotoras -238 e -308. Adaptado de Hajeer e Hutchinson (3).

1.5.2 - Polimorfismos da região promotora do TNF-α (-238A/G e -308A/G) e psoríase

O gene TNF-α tem uma região promotora que contém vários polimorfismos incluindo duas transições G/A na posição -308 e -238, que são mais comuns na população caucasiana (147, 148). Vários outros pontos de mutação têm sido descritos (149, 150).

Reich et al. (151) observaram, em estudo *in vitro*, que a presença do alelo -238*A estava associada com aumento da produção de TNF-α em pacientes com psoríase de início antes de 40 anos.

É descrita associação entre polimorfismo na posição -238 com psoríase e artrite psoriática em alguns estudos (152, 153, 154), embora haja controvérsias.

Na população americana, a homozigose para o alelo G na região -238 é associada a risco relativo menor para a doença, portanto conferindo resistência, enquanto a heterozigose está relacionada a risco aumentado para psoríase (152). Na população alemã, encontrou-se associação entre polimorfismo na região -238 do TNF- α com psoríase e artrite psoriática (38% e 32% respectivamente, contra 7% nos controles) (153).

Já não se encontraram associações entre polimorfismos na região -238 e -308 na população japonesa (155, 156). Na população coreana, segundo Kim et al. (157), não se encontrou relação entre psoríase e polimorfismos na região promotora do TNF- α , mas sim com genes do TNF- β .

O TNF- α é comprovadamente importante no desenvolvimento da doença e os SNPs de sua região promotora despertam especial interesse.

IMAGENS

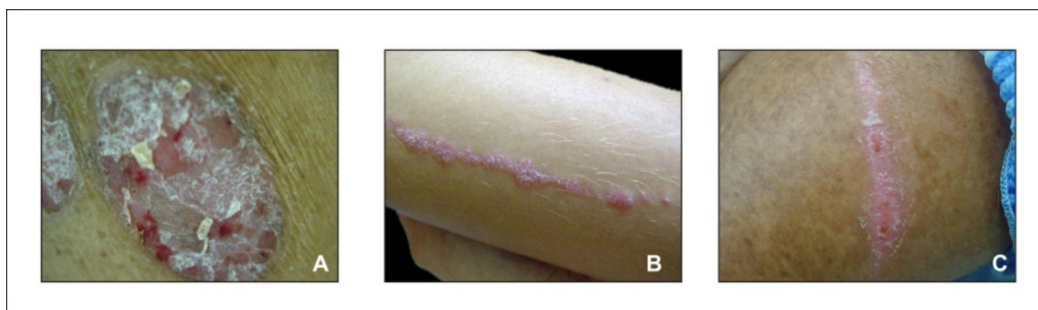


Imagem 1: Lesão cutânea da psoríase (A): eritema, escamas prateadas aderentes e sobrepostas e sinal do orvalho sangrento ou de Auspitz. **Fenômeno de Koebner** (B) Surgimento de uma lesão psoriática cinco dias após uma arranhadura na perna de uma criança com psoríase; (C) Lesão psoriática no braço de uma mulher após escoriação (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP).

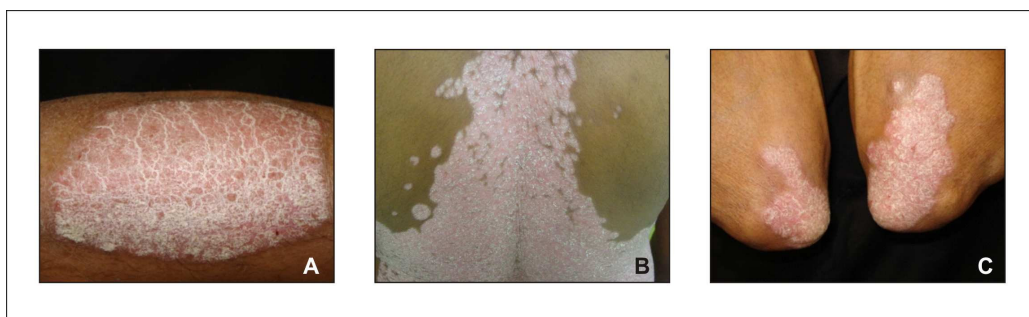


Imagem 2: Localizações clássicas da psoríase vulgar (A) na face anterior da perna; (B) no tronco simetricamente e (C) na face extensora dos cotovelos (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP).

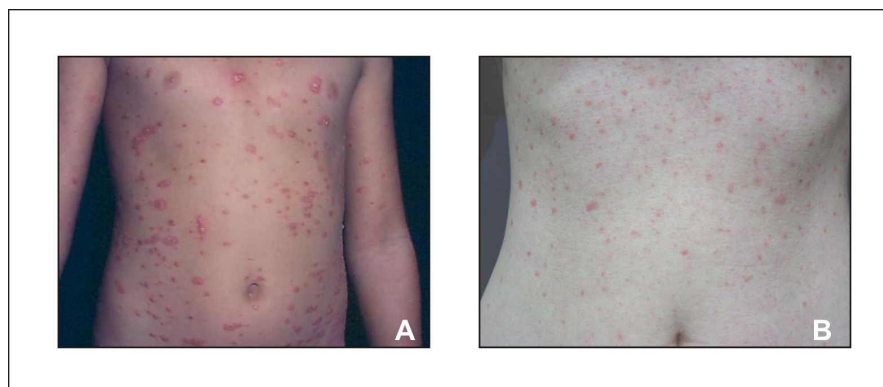


Imagem 3: Psoríase gutata (A e B) múltiplas lesões numulares eritemato-descamativas disseminadas (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP).



Imagem 4: Eritrodermia psoriática (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP).

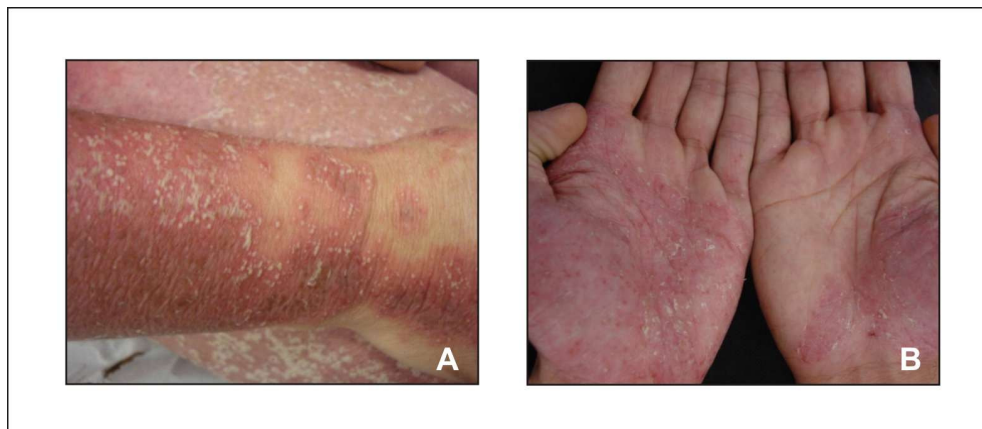


Imagem 5: Psoríase pustulosa (A) pustulose generalizada; (B) pustulose palmar, forma localizada mais comum (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP).



Imagem 6: Artrite psoriática (A) deformidade das articulações interfalangeanas, (B) eritema e aumento de volume destas articulações e (C) raio-X com diminuição do espaço articular e esclerose óssea (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP)



Imagem 7: Manifestações da psoríase (A) Psoríase palmar; (B) Psoríase plantar; (C) Psoríase ungueal com depressões cupuliformes e onicólise; (D) Intensa distrofia ungueal; (E) Lesões descamativas faciais; (F) Blefarite; (G e H) Lesões no couro cabeludo; (I e J) Psoríase invertida (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP).

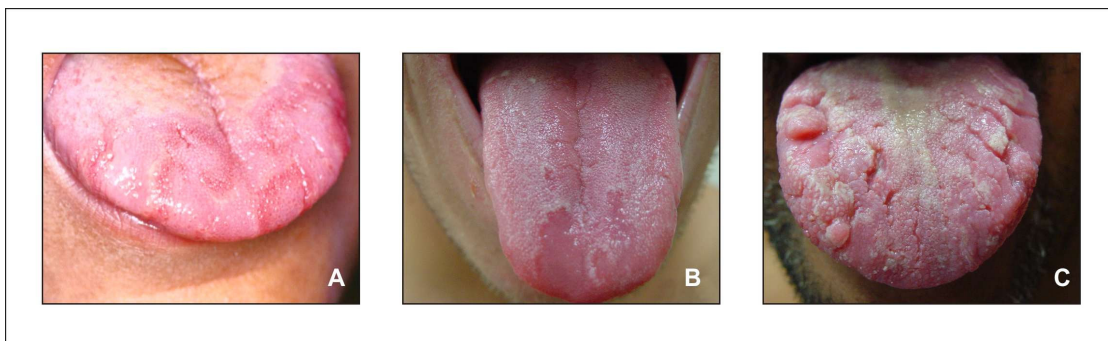


Imagem 8 : Língua geográfica (A e B) manifestação mucosa mais associada à psoríase, e (C) concomitância de língua fissurada e geográfica (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP).



Imagem 9: Psoríase infantil (A) lesões na face e couro cabeludo; (B) queilite psoriática (Arquivo da Disciplina de Dermatologia, FCM, UNICAMP).

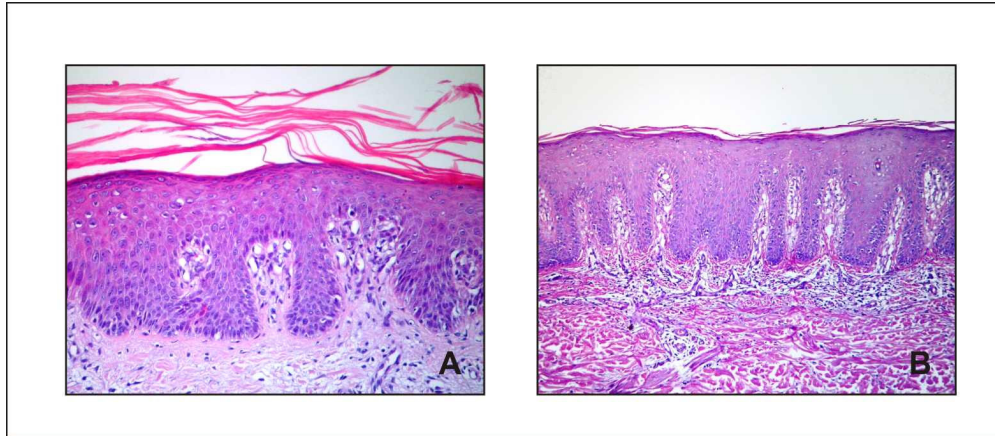


Imagem 10: Aspectos histológicos das fases iniciais da psoríase (A): infiltrado inflamatório peri-vascular e edema da derma papilar; **aspectos histológicos da lesão desenvolvida** (B): hiperplasia psoriasiforme da epiderme (Cortesia: Dr^a. Maria Letícia Cintra, Departamento de Anatomia Patológica, FCM, UNICAMP).

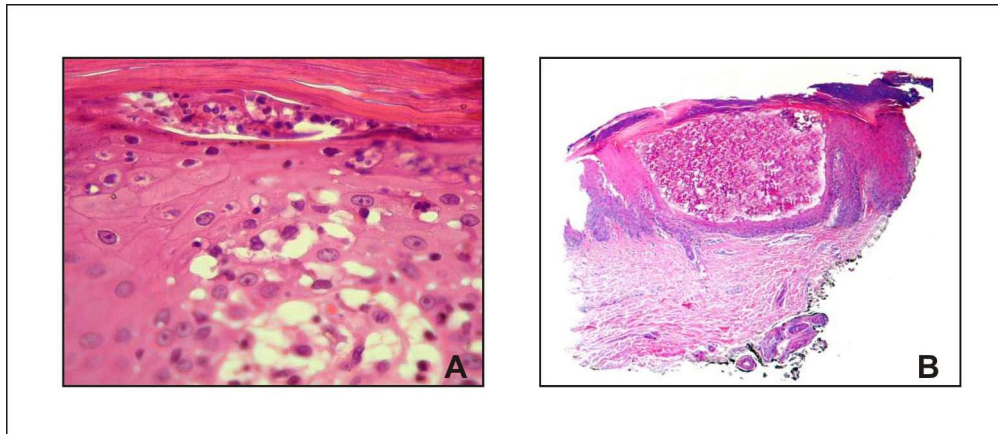


Imagem 11: (A) Microabscesso de Munro; (B) pústula espongiforme de Kogöj (Cortesia: Dr^a. Maria Letícia Cintra, Departamento de Anatomia Patológica, FCM, UNICAMP).

2 – OBJETIVOS

A associação de HLA classe I e psoríase é bem conhecida e diferente em várias populações, já os SNPs -238 e -308 da região promotora do TNF- α foram associados à doença em populações caucasóides e não em asiáticos. Não se encontrou, na literatura consultada até o momento, descrição da associação de polimorfismos da região promotora de TNF- α com psoríase em pacientes brasileiros. O intuito deste trabalho foi aprofundar o conhecimento sobre os fatores de risco genético para a psoríase nesta população e correlacionar os marcadores genéticos com fatores ambientais.

2.1 - Objetivo geral

Investigar o papel dos polimorfismos de genes do MHC classe I, II e III como fatores de susceptibilidade à psoríase e gravidade da doença na população brasileira.

2.2 - Objetivos específicos

- I. (A) Tipificar os alelos HLA de classe I e II dos pacientes e do grupo-controle de indivíduos sadios;
(B) Avaliar os alelos e genótipos dos HLAs de classe I e II nestes grupos.
- II. (A) Tipificar os polimorfismos na região promotora do TNF- α (SNPs -238 e -308) nos pacientes e grupo-controle de indivíduos sadios;
(B) Avaliar os alelos, genótipos e haplótipos estendidos dos SNPs do TNF- α nestes grupos.
- III. Analisar os marcadores de risco genético e de evolução da psoríase, na população brasileira estudada, referentes aos alelos HLA classe I e II e aos SNPs do TNF- α -238 e -308;
- IV. Discutir a aplicação prática dos alelos HLA classe I e II e dos SNPs -238 e -308 do TNF- α no seguimento de pacientes com psoríase, relacionando estes marcadores com fatores ambientais.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Casuística

3.1.1 - População de referência

A população estudada é predominantemente natural e procedente da região de Campinas, Estado de São Paulo, sendo dois paciente naturais do sul do Estado de Minas Gerais. Esta população é constituída por imigrantes caucasianos europeus, ameríndios brasileiros e negros. A variedade étnica implica na mistura de genes HLA presentes na população brasileira, podendo variar significativamente sobre determinada base regional. Entretanto, a amostra foi composta por indivíduos de cor branca, sendo apenas dois casos classificados como pardos.

3.1.2 - População de estudo

Foram estudados 69 pacientes do ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. O diagnóstico de psoríase foi baseado em critérios clínicos e a inclusão foi aleatória conforme entrada no serviço. Foi realizada investigação, abordando extensão do acometimento cutâneo, forma clínica, idade de início da doença, sexo, etnia, casos familiares e fatores desencadeantes (infecções, traumas, medicamentos e eventos estressantes como acidentes, morte na família e desagregação familiar). Foram consideradas outras manifestações clínicas, como acometimento ungueal, do couro cabeludo, das mucosas e alterações articulares (tabela 6, apêndice 2, página 197).

Os casos foram avaliados quanto à gravidade da doença, considerando-se o critério PASI (do inglês *Psoriasis Activity and Severity Index*). O índice PASI é calculado pelo médico e permite avaliar área acometida, grau de eritema, descamação e infiltração das lesões (anexo 1). Pode variar de 1 a 72, sendo que índice superior a 18 relaciona-se a doença grave (157, 158). Assim, os pacientes foram divididos em dois grupos:

- Grupo I (GI): doença localizada, estável, PASI menor que 18, com boa resposta aos tratamentos tópicos (corticóides, calcipotriol, tacrolimus,

coaltar e umectantes) e banho de sol, sem a necessidade de tratamento sistêmico ao longo da observação de dez anos, além de períodos de remissão prolongados. Foram observados casos de remissão total após a primeira crise.

- Grupo II (GII): doença extensa, PASI maior que 18, pouca resposta aos tratamentos tópicos, requerendo terapia sistêmica para controle, como acitretina, metotrexate, ciclosporina e etanercept. Estes pacientes apresentaram doença instável, alguns casos com episódios de eritrodermia e artrite, sem remissão do quadro cutâneo ao longo do acompanhamento.

Esta classificação foi empregada em trabalhos publicados anteriormente (135, 159).

De cada paciente avaliado ou de seu responsável, foi obtido o termo de consentimento pós-informado (apêndice 3). O protocolo de estudo foi devidamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Projeto: 299/2002, modificado em 2007, apêndice 4). Foi realizada documentação fotográfica dos casos. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Imunogenética de Transplantes do Hospital das Clínicas da UNICAMP e no Laboratório de Imunologia Básica e Aplicada do Hospital das Clínicas da USP de Ribeirão Preto.

3.1.3 - Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com idade de aparecimento dos primeiros sintomas até 40 anos, o que caracteriza a psoríase tipo I de Henseler e Christophers (13), com seguimento clínico regular, no período de 1997 a 2007. O longo período de acompanhamento destes pacientes permitiu caracterizar a evolução da doença e facilitou a definição de dois grupos de gravidades diferentes. Houve a preocupação de se trabalhar com uma amostra suficiente para validade estatística, o que motivou o cálculo do tamanho amostral.

3.1.4 - Critérios de exclusão

Não foram incluídos pacientes com idade de início da doença maior que 40 anos, parentes de primeiro grau dos indivíduos já selecionados, pacientes com diagnóstico duvidoso ou já em tratamento instituído em outro serviço.

3.1.5 - População controle

O grupo-controle constituiu-se de 70 indivíduos sadios, com a idade entre 18 a 53 anos, 30 mulheres e 40 homens, provenientes do Banco de Sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas-Hemocentro, da mesma região geográfica dos pacientes, sem antecedente pessoal ou familiar de psoríase, geneticamente não relacionados. A busca de indivíduos sadios para grupo-controle entre doadores de sangue é uma prática utilizada em muitas publicações de várias partes do mundo para estudos imunogenéticos.

3.2 - Características do grupo de pacientes

Analisando o grupo total de 69 pacientes, a média de idade de início da doença foi de 15,1 anos, 30,5% eram do sexo masculino 69,5% do sexo feminino. A forma clínica da doença mais comum foi a psoríase vulgar em 81,1%, seguida da psoríase gutata com 18,9%. A presença de um ou mais parentes de primeiro grau acometidos ocorreu em 45% dos pacientes, sendo 33,3% no grupo I e 57,6% no grupo II. Houve predominância do antecedente familiar positivo para a doença no grupo de pior evolução (tabela 6, apêndice 2, página 197).

3.2.1 - Grupo I

O grupo I foi constituído por pacientes que apresentaram, ao longo do acompanhamento, doença considerada leve. Enquadraram-se neste grupo 36 pacientes. Destes, a média de idade de início da doença foi de 15,3 anos, 19,5% do sexo masculino e 80,5% do sexo feminino. Quanto à forma clínica, 94% foram psoríase vulgar e 6% psoríase gutata. Dentro deste grupo, dois casos eram de psoríase linear, desde os primeiros meses de vida, de distribuição névica no

membro inferior, que desenvolveram outras lesões psoriáticas durante a adolescência, no couro cabeludo, cotovelos e joelhos, respondendo bem ao tratamento tópico e retornando à forma linear (160).

Dezesseis pacientes apresentaram remissão da doença após a abordagem terapêutica, em um prazo de oito a 33 meses, perfazendo 23,1% do grupo total de pacientes e 44,4% dos pacientes do grupo I, e não voltaram a desenvolver novas lesões ao longo do seguimento.

3.2.2 - Grupo II

O grupo II, composto por pacientes que desenvolveram psoríase grave, contou com 33 indivíduos. Entre estes, 42,4% eram homens e 57,6% mulheres. Quanto à forma clínica, 66,7% apresentaram psoríase vulgar e 33,3% psoríase gutata. Dentro destes casos de evolução desfavorável, observaram-se cinco pacientes que desenvolveram artrite psoriásica (15,1% deste grupo e 7,25% do grupo total de pacientes) e três casos apresentaram eritrodermia (9,1% deste grupo e 4,35% do grupo total de pacientes). Seis pacientes utilizaram terapia anti-TNF (etanercept), por não responderem a outros tratamentos sistêmicos (18,2% deste grupo e 8,7% do grupo total de pacientes) (tabela 7).

Tabela 7: Características clínicas dos pacientes com psoríase no grupo I (GI) e II (GII) e frequência (%) do evento em cada grupo.

Características	GI N=36 (%)	GII N=33 (%)	TOTAL
Idade (média, em anos)	15.3	14.9	15.1
Mulheres	29 (80,5)	19 (57,6)	48 (69,5)
Homens	7 (19,5)	14 (42,4)	21 (30,5)
PV	34 (94,0)	22 (66,7)	56 (81,1)
PG	2 (6,0)	11 (33,3)	13 (18,9)
AP	0	5	5 (7,2)
Eritrodermia	0	3	3 (4,3)
Anti-TNF	0	6	6 (8,6)
AF +	12 (33,3)	19 (57,6)	31 (45,0)
AF -	24 (66,7)	14 (42,4)	38 (55,0)

N: número de indivíduos; Idade (média, em anos): média de idade de surgimento da doença em anos; PV: psoríase vulgar; PG: psoríase gutata; AP: artrite psoriásica; Anti-TNF: pacientes que usaram terapia anti-TNF; AF+: antecedente familiar presente; AF-: antecedente familiar ausente; GI: grupo I; GII: grupo II.

3.2.3 - Manifestações clínicas da doença

Outras manifestações clínicas estudadas estão assinaladas na tabela 8.

Tabela 8: Manifestações clínicas dos pacientes com psoríase no grupo I (GI) e II (GII) e frequência (%) do evento em cada grupo.

Características	GI N=36 (%)	GII N=33 (%)	TOTAL
Idade de início da doença (média, em anos)	15,3	14,9	15,1
• Início entre 0 e 9	12	6	18
• Início entre 10 e 19	15	22	37
• Início entre 20 e 29	4	2	6
• Início entre 30 e 40	5	3	8
Acometimento ungueal	15 (41,7)	23 (69,7)	38
Acometimento do couro cabeludo	29 (80,5)	26 (78,8)	55
Acometimento mucoso	3 (8,3)	9 (27,3)	12
Presença de fatores desencadeantes	20 (55,5)	24 (72,7)	44

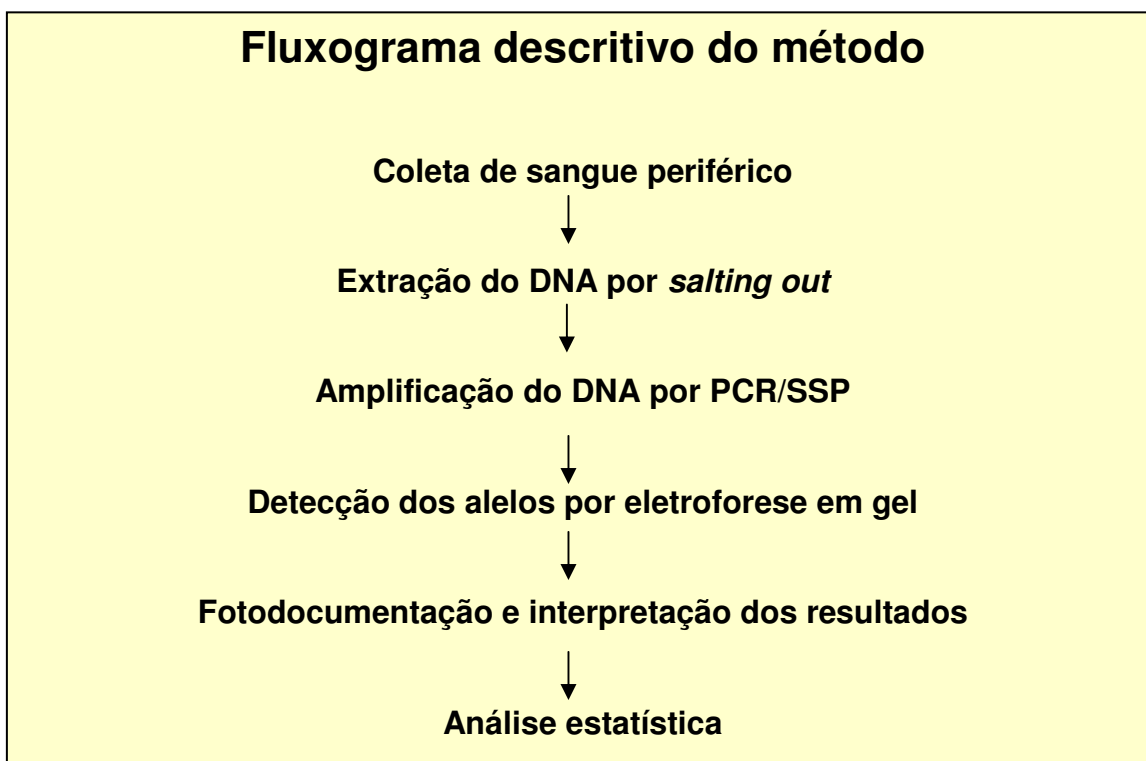
N: número de indivíduos; GI: grupo I; GII: grupo II.

Quanto à idade de aparecimento dos primeiros sintomas, duas meninas e um menino iniciaram manifestações da psoríase antes de um ano de idade, sendo um caso de dermatite psoriasiforme das fraldas e os dois de lesão psoriasiforme linear. Observa-se que a maioria dos casos teve início na adolescência, entre dez e 19 anos. No grupo I, houve mais casos com início até dez anos do que no grupo II e, neste, a maioria dos pacientes iniciaram a doença entre dez e 19 anos. O início na adolescência esteve associado a pior evolução da doença.

Trinta e oito pacientes apresentaram psoríase ungueal (55%) e houve predominância da presença de lesões ungueais no grupo de pior evolução. Quanto ao acometimento do couro cabeludo, 55 pacientes (79,7%) apresentaram este achado. Vinte e nove casos (80,5%) estavam no grupo I e 26 (78,8%) no grupo II. O número de pacientes com lesões mucosas neste grupo foi 12 (17,39% do total de pacientes estudados), sete mulheres e cinco homens. Três pacientes (8,3%) encontravam-se no grupo I e nove (27,3%) no grupo II. Este achado foi mais significativo no grupo de pior evolução. O padrão de lesão mucosa mais encontrado foi língua geográfica, assintomática e recorrente. Uma das meninas apresentava lesões peri-orais intensas e queilite. Lesões penianas foram encontradas em três pacientes, na forma de placas eritemato-descamativas ou maceradas, com exame micológico direto negativo.

Fatores desencadeantes que precederam o quadro clínico da psoríase foram notados em 44 pacientes (63,8%), sendo 20 (55,5%) no grupo I e 24 (72,7%) no grupo II. Houve maior associação com o grupo de pior evolução. Os fatores relacionados, em sua maior parte, foram de origem emocional e são considerados eventos estressantes agudos, ocorridos entre dois meses até quatro anos antes do surgimento das lesões psoriáticas. Estes eventos foram: dissociação familiar (29 casos), falecimento de um dos pais (três casos), nascimento de um irmão com síndrome de Down (um caso), etilismo na família (cinco casos) e irmão drogadito (um caso). Infecções prévias foram observadas em apenas cinco pacientes (dois casos de amigdalite e três de sinusite bacteriana).

Uma paciente com psoríase vulgar extensa desenvolveu eritrodermia após a associação de isoniazida e prednisona para o tratamento de tuberculose ganglionar com esquema tríplice, voltando a apresentar psoríase vulgar após a suspensão da droga e a troca do esquema antibiótico. Outro paciente masculino desenvolveu eritrodermia relacionada à introdução de tratamento psiquiátrico com a carbamazepina, também voltando à forma vulgar após a troca do medicamento.



3.3 - Tipificação do HLA de classe I e II

3.3.1 - Caracterização do ensaio

A extração e purificação do DNA foram realizadas através do método *salting out*, introduzido por Miller et al. (161). O DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com um conjunto de iniciadores ou *primers* sequência-específica, segundo a metodologia desenvolvida por Olerup e Zetterquist (162), utilizando-se microplacas contendo os *primers* para classe I e II

genérico, adquiridas comercialmente da One Lambda Inc., Canoga Park, CA, EUA.

Os reagentes e materiais utilizados estão relacionados no apêndice 3.

3.3.2 - Coleta de material

Foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico dos pacientes e dos indivíduos sadios do grupo-controle em tubos contendo anticoagulante EDTA.

3.3.3 - Extração do DNA

Promoveu-se a extração do DNA pelo método *salting out* a partir de células do sangue periférico (161), que consiste na precipitação com solução saturada de NaCl das proteínas celulares (imagem 12, página 99).

O sangue total foi transferido para um tubo cônico de polipropileno estéril de 50 mL. Foram adicionados 40 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos. Em seguida a solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada durante cinco minutos a 2.400 xg (3.200 r.p.m.) a 4°C (centífuga Beckman J-6B, EUA). O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o precipitado ressuspensionado em 4,5 mL do tampão de lise de glóbulos brancos, acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS), que funciona como inibidor de nucleases, e perclorato de sódio, para precipitar o material nucleico, e agitado vigorosamente. Para a extração de proteínas, foram adicionados 2 mL de NaCl 6M e foi promovida a agitação vigorosa durante 15 segundos à temperatura ambiente. Após uma segunda centrifugação a 1.500 xg (2.600 r.p.m.) por cinco minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL, evitando o precipitado, e foi adicionado 7 mL de isopropanol absoluto. O tubo foi homogeneizado gentilmente para a precipitação e ressuspensão do DNA.

O DNA precipitado foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril e lavado três vezes em 3 mL de 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 (WPD, Biowave II, EUA), 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.

3.3.4 - Reação em cadeia da polimerase com *primers* sequência-específica (PCR/SSP) para HLA classe I e II

A reação de polimerase em cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando à produção de milhões de cópias dessa sequência em um tubo de ensaio. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima DNA polimerase, capaz de adicionar nucleotídeos fornecidos para a reação de acordo com o complementar na fita-molde. É necessário um ponto de início ligado à fita-molde para a enzima continuar a colocação de outros nucleotídeos. Este ponto é um oligonucleotídeo sintético que se hibridiza ou anela à fita-molde simples, chamado *primer*. Estes *primers* específicos devem ser fornecidos a cada fita-molde para servirem à síntese de uma nova cadeia (136) (figura 7).

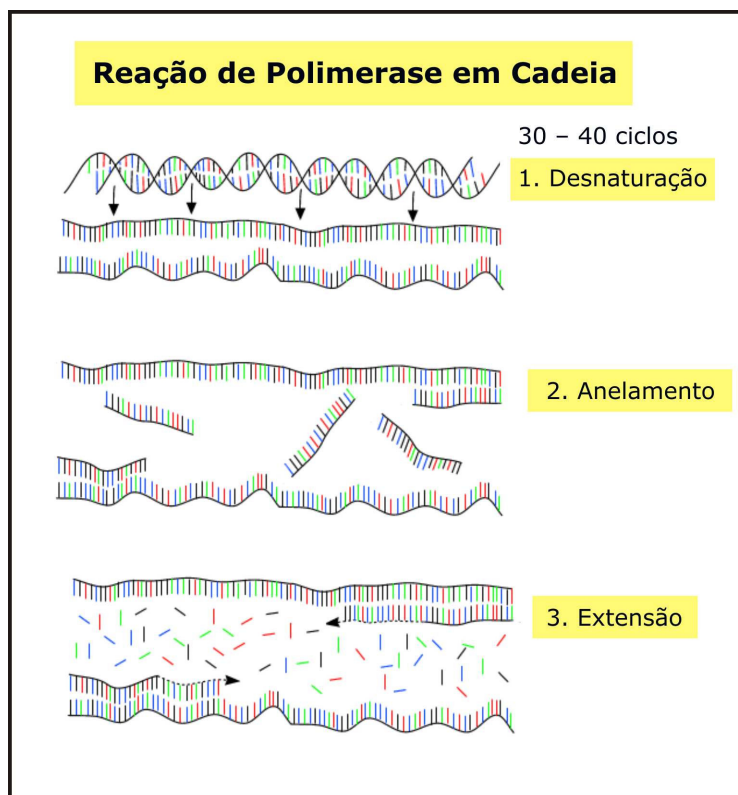


Figura 7: Esquema representativo da reação de PCR. Adaptado de Vierstraete (163).

Na prática, adicionam-se, em um tubo de ensaio, uma pequena quantidade de DNA genômico, nucleotídeos, enzima DNA-polimerase, os *primers* e uma solução-tampão que fornece condições ideais de pH e salinidade. O conjunto é submetido a alta temperatura (94°C por cinco minutos) para o rompimento das pontes de hidrogênio entre as duas cadeias de DNA. A temperatura é rebaixada (65°C por 30 segundos), quando os *primers* se anelam às sequências complementares de DNA. A temperatura vai a 72°C por dois a cinco minutos para atuação da DNA polimerase, formando novas cadeias com os nucleotídeos. Repetindo-se estes passos de desnaturação, anelamento e síntese por 25 a 30 ciclos, obtêm-se mais de 250 milhões de cópias de DNA em fita dupla (136).

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, enzima Taq-polimerase (5 U/ μL), padronizado e fornecido pela One Lambda (One Lambda Inc., Canoga

Park, CA, EUA) (tabela 9). Inicialmente, foram retirados 9µL da solução (mix) e adicionados na escavação do controle negativo, previamente preparada com 1 µL de água deionizada estéril. A seguir, foi adicionado o DNA genômico na concentração final de 100 ng/mL ao restante da solução (mix). Foram colocados 10 µL em cada um dos poços da placa, exceto no controle negativo (imagem 13, página 99).

Pelo método PCR/SSP, foram realizadas as identificações dos alelos HLA classe I, através de amplificações para 18 especificidades HLA-A, 33 HLA-B e 14 HLA-C. Para os alelos classe II, foram 15 especificidades HLA-DRB1 e cinco HLA-DRQ1.

Tabela 9: Concentrações dos reagentes utilizados para a amplificação dos alelos HLA classe I e II.

Reagente	Concentração (ng/mL)	Volume (µL)
Classe I - DMix		
Taq-p		5,6
DNA	100	111
Classe II – Dmix		
Taq-p		2,0
DNA	100	39

DMix: mistura de nucleotídeos fornecida pelo fabricante para a reação de polimerase em cadeia (PCR); Taq-p: enzima Taq-polimerase; DNA: quantidade de DNA colocada em cada flaconete.

Para a amplificação do DNA, a microplaca foi colocada em um termociclador (MJ-PTC-100/Watertown, MA, EUA), com 30 ciclos, nas temperaturas indicadas na tabela 10.

Tabela 10: Perfil de ciclagem do termociclador para reação de amplificação dos alelos HLA classe I e II.

Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
1. Desnaturação	94	2 min.	1X
	59	1 min.	
2. Pareamento	94	10 seg.	8X
	59	1 min.	
3. Extensão	94	10 seg.	19X
	55	50 seg.	
	72	30 seg.	
	4		

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%.

3.3.5 - Análise do produto amplificado em gel de agarose

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, em que, posteriormente, foram aplicadas as amostras. Após a retirada dos pentes, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese e foi adicionada a solução tampão (Tris-Borato-1X) 2 a 3 mm acima da superfície do gel.

Foram aplicados os produtos da amplificação e o controle negativo ao gel e a eletroforese foi realizada por seis minutos a 220V. Após esse período, o gel foi colocado em um transluminador ultravioleta (312nm) e fotografado para documentação e interpretação (sistema de fotodocumentação Vilber Lourmat BP66, Marné-La Vallée, France).

3.3.6 - Fotodocumentação e interpretação dos resultados

A interpretação foi baseada na presença ou ausência de amplificação do 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 de tal *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 pb, 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 (imagem 14, página 101).

Os resultados foram inseridos em uma planilha, que apresenta as mesmas especificidades encontradas na placa com os *primers*, e em um programa de computador, da One Lambda Inc., Canoga Park, CA, EUA, que auxilia na interpretação, permitindo revelar com exatidão os alelos dos pacientes e do grupo-controle de indivíduos sadios em estudo.

3.4 - Tipificação dos SNPs do TNF- α -238 e -308

As amostras do DNA genômico dos 69 pacientes com psoríase e 70 indivíduos sadios do grupo-controle foram tipificadas através de PCR/SSP.

3.4.1 - Reação em cadeia da polimerase com *primers* sequência-específica (PCR/SSP) para SNPs do TNF- α

O polimorfismo de genes promotores do TNF- α foi avaliado quanto à presença dos SNPs -238A/G e -308A/G, relacionados com atividade transcricional alterada. Para a detecção destes polimorfismos, utilizaram-se sondas de oligonucleotídeos sequência-específicas e os iniciadores específicos para cada variante estão descritos na tabela 11. Os iniciadores HGBA. A e HGBA. S (genes da hemoglobina) foram empregados como controle interno de cada reação (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

Tabela 11: Iniciadores para detecção dos SNPs -238 e -308 do gene TNF- α .

Primers	Sequência (5' – 3')	Amplicon
TNFAA308.2	CAGCGGAAACTTCCTTGGT	259 pb
TNF Genérico ^a		
TNFAS308G	ATAGGTTTTGAGGGGCATGG	
TNF Específico ^b		
TNFAS308A	ATAGGTTTTGAGGGGCATGA	
TNF Específico ^b		175 pb
TNF 238 UP	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	
TNF Genérico ^a		
TNFAS238G	CCCCATCCTCCCTGCTCC	
TNF Específico ^b		
TNFAS238A	TCCCCATCCTCCCTGCTCT	436 pb
TNF Específico ^b		
HGBA.S ^c	CGGTATTTGGAGGTCAGCAC	
HGBA .A ^c	CCCACCACCAAGACCTACTT	

^aTUGLULAR et al., 2003; ^bMARSH et al., 2003; ^c: HGBA e HGBS: genes da hemoglobina utilizados para controle da reação, sintetizados a pedido do laboratório de Ribeirão Preto.

Aos *primers*, em tubos de propileno tipo Eppendorf com tampa, foram adicionados os reagentes para as reações de PCR (imagem 15, página 103), nas concentrações indicadas na tabela 11. A esta solução, foi adicionado 1uL do DNA a ser estudado (tabela 12).

Tabela 12: Concentrações dos reagentes utilizados para a amplificação dos SNPs do TNF- α -238 e -308.

Reagente	Concentração	Quantidade (ul)
Água		6,41
Tampão	10 X	1
MgCl ₂	50 mM	0,3
dNTP	20 mM	0,14
HGBA-S	10uM	0,2
HGBA-A	10 uM	0,2
308A ou 308G*	10uM	0,3
TNF 308.2*	10uM	0,3
Taq Polimerase	5 U/ul	0,15
DNA	100ng	1
Volume final	-	9

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato;

*Na reação para amplificação do SNP -238, os *primers* foram os correspondentes enquanto os demais reagentes foram empregados na mesma concentração.

Após a preparação da mistura da reação de amplificação, essas foram submetidas a PCR nos seguintes ciclos no termociclador (Applied Biosystems 9700), conforme mostrado na tabela 13.

Tabela 13: Perfil de ciclagem no termociclador para reação de amplificação dos SNPs do TNF- α -308 e -238.

Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min.	1X
1. Denaturação	94	4 seg.	32X
2. Pareamento	64	4 seg.	
3. Extensão	72	1 min.	
	72	5 seg.	1X
	4		

3.4.2 - Análise do Produto Amplificado em Gel Poliacrilamida

Os produtos de amplificação foram submetidos à separação por eletroforese em condições desnaturantes, utilizando-se géis de poliacrilamida acrescidos de glicerol.

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 e corados de acordo com o método de Sanguinetti et al. (164), como descrito a seguir.

Após a preparação, o gel foi imediatamente aplicado a uma armação previamente montada. Esta armação foi composta 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 formaram os sulcos em que, posteriormente, foram aplicadas as amostras. Após a polimerização do gel, o pente foi retirado e o gel foi montado em uma cuba de eletroforese vertical, contendo tampão TBE (o mesmo utilizado na preparação do gel, diluído 10X) em ambos os pólos (imagem 16, página 103).

Para a realização da corrida eletroforética, 3 μ L da amostra a ser analisada foi misturada a 7 μ L de tampão de amostra contendo formamida 75%. A mistura foi aquecida a 94°C por dez minutos e foi colocada imediatamente em banho de gelo e aplicada ao gel. Os padrões de migração que permitem identificar os alelos 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. O gel foi submetido à eletroforese a 20mA, 230V por uma hora (Imagem 17, página 105).

3.4.3 - Visualização e interpretação dos resultados

Após ser retirado da placa, o gel foi colocado em 100 mL de solução fixadora (álcool etílico, ácido acético e água deionizada) por cinco minutos e foram adicionados, para coloração, 2 mL de nitrato de prata 10%, com agitação por cinco 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 100 mL de solução reveladora (NaOH e água deionizada) com 1 mL de formaldeído sobre o gel, que foi agitado até o aparecimento das bandas (imagem 18, página 105).

Após as leituras das bandas reveladas nos géis, estes foram secos e 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 dois dias (imagem 19, página 107).

3.5 - Análise estatística

3.5.1 - Tamanho amostral

Este cálculo foi realizado para se estimar a validade dos testes a serem aplicados na amostra proposta, um grupo de 139 indivíduos. Existem várias formas de se calcular o tamanho amostral. Para isto é necessário a escolha de níveis de significância (normalmente 5%), poder do teste (no mínimo 80%) e diferença nas frequências alélicas que se deseja detectar caso existam (165).

Com base nos dados preliminares do grupo-controle de indivíduos sadios sobre a variável que se deseja estudar (SNPs do TNF- α) e por meio de cálculo estatístico realizado por programa computacional, estima-se que:

- para os SNPs -238, caso exista uma diferença de 15% nas frequências alélicas entre as populações de pacientes e controles, será necessária uma amostra de 120 indivíduos (60 pacientes e 60 controles) para ter 80% de chance de detectá-la ao nível de significância de 5% (165);
- para os SNPs -308, caso exista uma diferença de 20% nas frequências alélicas entre as populações de pacientes e controles, será necessária uma amostra de 128 indivíduos (64 pacientes e 64 controles) (165).

Assim, a amostra de 139 indivíduos foi considerada para a realização do trabalho.

3.5.2 - Frequências alélicas e gênicas dos HLA classe I e II e dos SNPs do TNF- α -238 e -308

As frequências alélicas e gênicas em cada grupo de amostras foram estimadas por contagem direta. O cálculo das frequências dos alelos nos grupos amostrais foi baseado na fórmula abaixo e foi realizado pelo programa GraphPad InStat 3.05 para Windows (Graph Pad Software Inc., Ca, EUA).

$$Fa (\%) = (n / 2N) \times 100$$

n: soma de um alelo específico; N: número total de indivíduos.

A análise estatística de comparação entre as frequências alélicas do grupo de pacientes e do grupo-controle foi efetuada por meio do teste do Qui-quadrado, utilizando a tabela de contingência 2x2 (166) ou Teste Exato de Fisher. O Teste Exato de Fisher foi mais adequado neste estudo para as comparações entre os grupos de pacientes e grupo-controle de indivíduos sadios, pois é indicado principalmente para os casos em que uma proporção inferior a cinco seja esperada em uma ou mais classes.

	nº indivíduos com alelo X	nº indivíduos sem alelo X	TOTAL
População 1	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>a+b</i>
População 2	<i>c</i>	<i>D</i>	<i>c+d</i>
	<i>a+c</i>	<i>b+d</i>	<i>N=a+b+c+d</i>

a: número de indivíduos com alelo X na população 1; *b*: número de indivíduos sem o alelo X na população 1; *c*: número de indivíduos com alelo X na população 2; *d*: número de indivíduos sem o alelo X na população 2.

A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$, o que significa que foi fixado em 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade. O valor de p foi corrigido (pc) através da multiplicação pelo número de alelos estudados e comparações realizadas, pelo método de Bonferroni (167, 168), devido ao polimorfismo extenso dos genes HLA.

Ao final, calculou-se o Odds Ratio (OR), que permite fazer uma estimativa do risco relativo em estudos caso-controle, segundo a fórmula abaixo. Foi realizado pelo programa GraphPad InStat versão 3.05 para Windows (Graph Pad Software Inc., Ca, EUA).

$$OR = ad / bc$$

OR: Odds Ratio; *a*: número de indivíduos com alelo X na população 1; *b*: número de indivíduos sem o alelo X na população 1; *c*: número de indivíduos com alelo X na população 2; *d*: número de indivíduos sem o alelo X na população 2.

O OR é utilizado como medida de intensidade de associação ou razão de probabilidades, e deve ser maior do que um para se afirmar que há associação positiva entre a ocorrência do gene e aumento do risco de desenvolver a doença. É importante expressar o OR com o respectivo intervalo de confiança (IC95%) (169).

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com emprego do programa GENEPOP versão 2.0 para Windows (170).

3.5.3 - Métodos computacionais para reconstrução de haplótipos

Algumas amostras podem apresentar dois SNPs heterozigóticos, que resultam em mais de uma possibilidade de combinação haplótípica. Dois métodos computacionais foram usados para determinar os haplótipos de cada indivíduo:

(1) o algoritmo ELB (171) implementado pelo programa computacional ARLEQUIN 3.1 para Windows (172);

(2) um método de base coalescente implementado pelo programa computacional PHASE v2 para Windows (173).

Para se verificar a existência de haplótipos em frequências significativamente distintas entre grupos de amostras, as frequências de cada haplótipo foram comparadas pela aplicação do Teste Exato de Fisher (GraphPad InStat, versão 3.0 para Windows, Graph Pad Software Inc., Ca, EUA).

IMAGENS

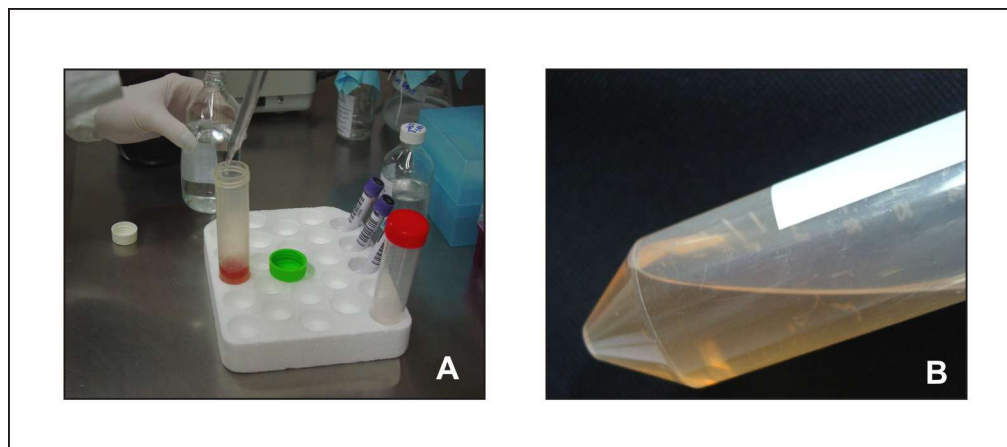


Imagem 12: Extração do DNA (A) adição dos reagentes para extração do DNA de amostra do sangue periférico em tubo de propileno de 50mL; (B) visualização do DNA após extração.

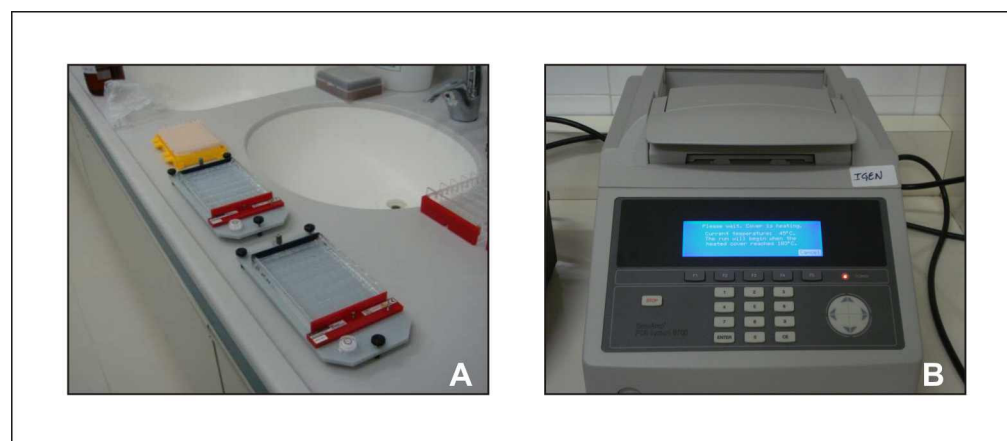
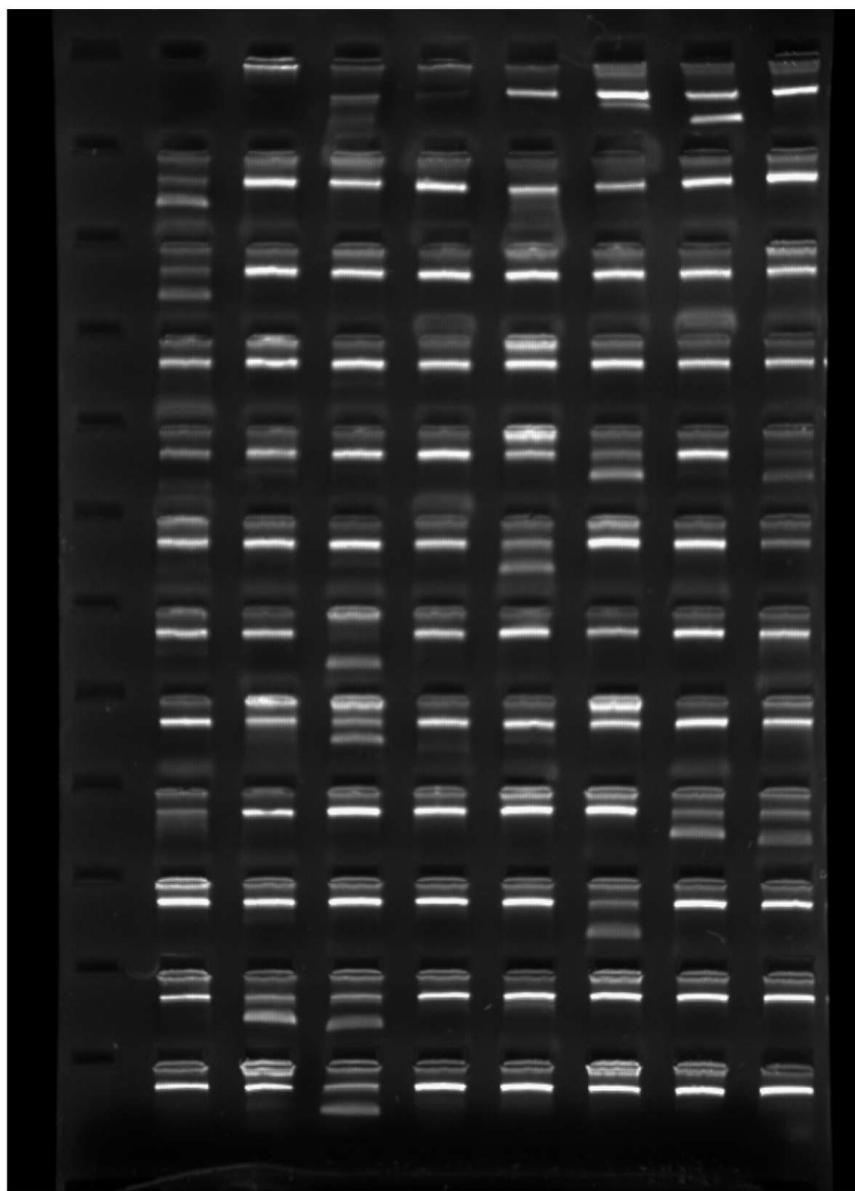


Imagem 13: Preparação da PCR/SSP (HLA): (A) microplacas One Lambda, para aplicação dos reagentes; (B) termociclador (MJ-PTC-100/Watertown, MA, EUA).



A*02 A*03, B*57 B*35, Cw*06 Cw*04

Imagem 14: Gel de agarose 2% mostrando a mobilidade eletroforética dos polimorfismos da classe I. As bandas superiores correspondem ao controle interno da reação o que certifica a boa qualidade do procedimento. As bandas que aparecem esporadicamente na terceiro nível são referentes aos alelos classe I identificados.

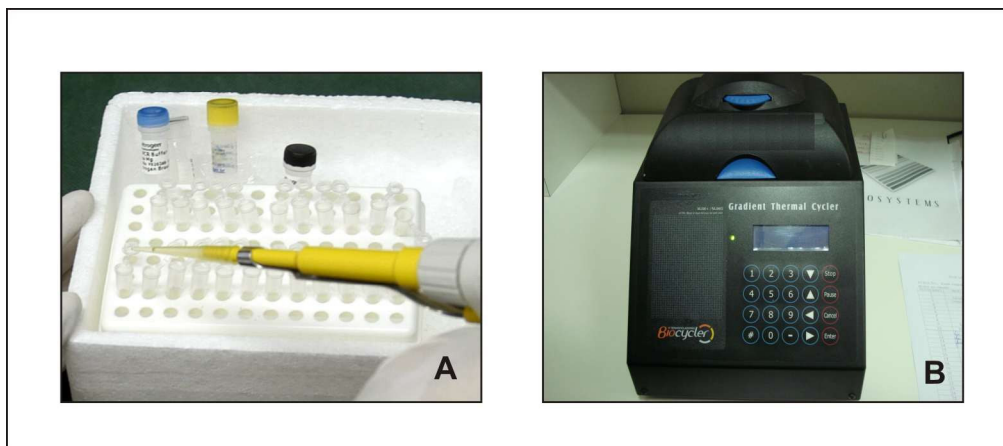


Imagem 15: Preparação da PCR/SSP (SNPs -238 e -308 do TNF- α): (A) adição de reagentes, *primer* e amostras de DNA a serem estudadas aos tubos de propileno tipo Eppendorf; (B) termociclador Applied Biosystems 9700 utilizado para reação de amplificação.

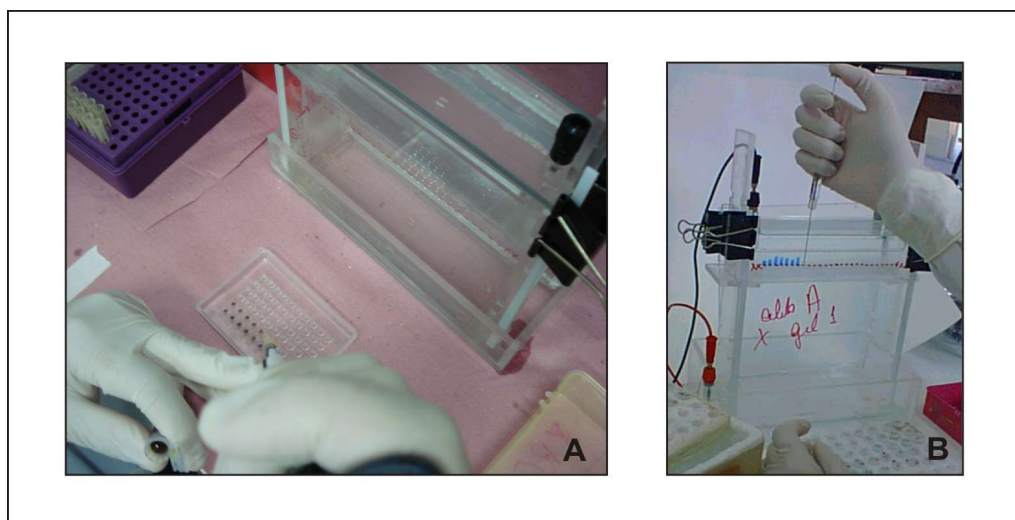


Imagem 16: Preparação para eletroforese em gel de poliacrilamida (A) aplicação dos produtos da PCR em microplacas com adição de corante; (B) aplicação das amostras com corante ao gel de poliacrilamida, em cuba de eletroforese vertical.

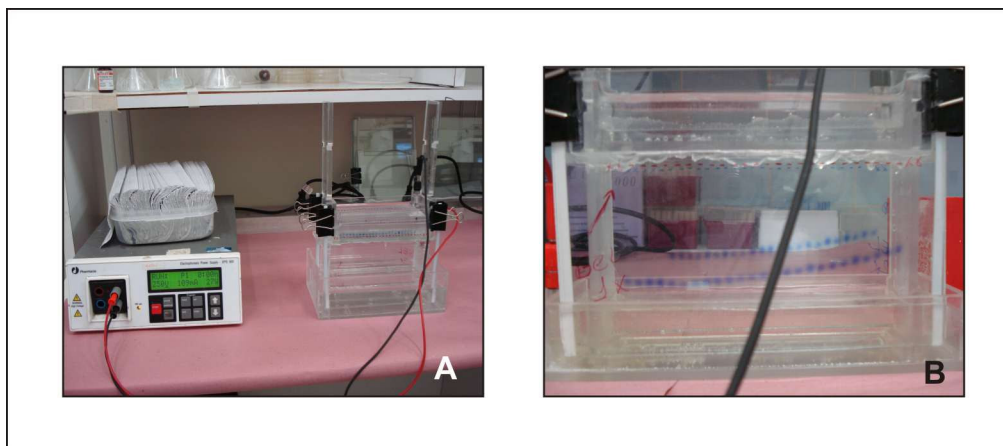


Imagem 17: Montagem da eletroforese e resultado da corrida eletroforética (A) início da eletroforese a 20 mA, 230V, por 1 hora; (B) fim da corrida eletroforética, evidenciando as bandas regularmente distribuídas ao longo do gel.

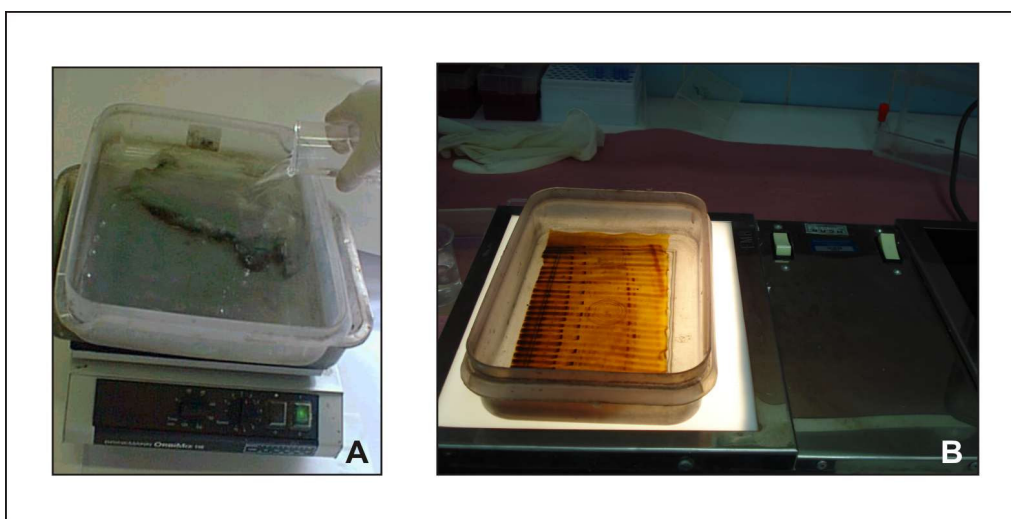


Imagem 18: Coloração com nitrato de prata e visualização dos resultados (A) o gel foi colocado em recipiente plástico sob agitação e coberto com solução fixadora e corante nitrato de prata 10%; (B) o gel foi lavado, adicionado de solução reveladora e submetido a nova agitação. A visualização das bandas foi possível através de iluminação ao fundo do recipiente.

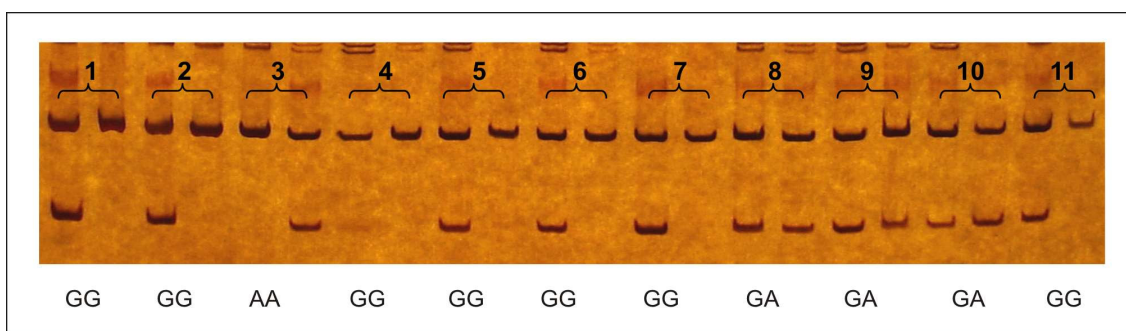


Imagem 19: Gel de poliacrilamida 10% mostrando a mobilidade eletroforética dos polimorfismos do SNP - 308 do TNF- α . A banda de 456 pb é referente ao controle interno da reação (genes da Hemoglobina Humana, iniciadores HBBA.S/HGBA.A). As bandas de 259 pb representam o polimorfismo G/A da região promotora -308 do gene TNF- α .

4 - RESULTADOS

4.1 - Pacientes e Controles

A relação dos pacientes e dos respectivos alelos HLA classe I e II e SNPs do TNF- α -238 e -308 detectados estão representados na tabela 26 (apêndice 2).

4.2 - HLA classe I e II

Após a tipificação dos alelos HLA dos pacientes e grupo-controle de indivíduos sadios, foram analisadas as frequências alélicas de classe I e II, conforme mostram as tabelas 14 e 15.

Tabela 14: Distribuição das frequências (%) dos alelos HLA-A, -B, -Cw nos pacientes com psoríase e no grupo-controle de indivíduos sadios.

Psoríase			Controle			Psoríase			Controle			Psoríase			Controle		
Alelo HLA-A*			Alelo HLA-B*			Alelo HLA-Cw*											
N=69			N=70			N=69			N=70			N=69			N=70		
(n) %			(n) %			(n) %			(n) %			(n) %			(n) %		
*01	(10)	7,3	(14)	10,0		*07	(05)	3,7	(10)	7,2		*01	(02)	1,5	(05)	3,6	
*02	(28)	20,3	(33)	23,6		*08	(03)	2,2	(09)	6,5		*02	(05)	3,7	(08)	5,7	
*03	(10)	7,3	(16)	11,5		*13	(07)	5,1	(01)	0,7		*03	(08)	5,8	(09)	6,5	
*11	(05)	3,7	(06)	4,3		*14	(07)	5,1	(11)	7,9		*04	(20)	14,5	(23)	16,4	
*23	(06)	4,4	(03)	2,2		*15	(08)	5,8	(09)	6,5		*05	(04)	2,9	(14)	10,0	
*24	(14)	10,0	(12)	8,6		*18	(02)	1,5	(03)	2,2		*06	(36)	26,1	(14)	10,0	
*25	(00)	0,0	(01)	0,7		*22	(00)	0,0	(00)	0,0		*07	(16)	11,6	(13)	9,3	
*26	(06)	4,4	(05)	3,6		*27	(07)	5,1	(06)	4,3		*08	(06)	4,4	(10)	7,3	
*29	(03)	2,2	(02)	1,4		*35	(13)	9,4	(16)	11,5		*12	(22)	16,0	(08)	5,7	
*30	(08)	5,8	(05)	3,6		*37	(08)	5,8	(02)	1,4		*14	(02)	1,5	(02)	1,4	
*31	(01)	0,8	(01)	0,7		*38	(05)	3,7	(05)	3,6		*15	(04)	2,9	(09)	6,5	
*32	(06)	4,3	(08)	5,7		*39	(10)	7,3	(03)	2,2		*16	(01)	0,8	(06)	4,3	
*33	(02)	1,5	(04)	2,9		*40	(04)	1,9	(04)	2,9		*17	(02)	1,5	(03)	2,2	
*34	(00)	0,0	(00)	0,0		*41	(02)	1,5	(03)	2,2		*18	(02)	1,5	(00)	0,0	
*36	(01)	0,8	(01)	0,7		*42	(00)	0,0	(00)	0,0							
*66	(02)	1,5	(01)	0,7		*44	(06)	4,4	(11)	7,9							
*68	(05)	3,7	(08)	5,7		*45	(03)	2,2	(06)	4,3							
*74	(00)	0,0	(00)	0,0		*47	(02)	1,5	(02)	1,4							
						*48	(00)	0,0	(02)	1,4							
						*49	(02)	1,5	(04)	2,9							
						*50	(07)	5,1	(03)	2,2							

*51	(05) 3,7	(11) 7,9
*52	(03) 2,2	(03) 2,2
*53	(04) 2,9	(02) 1,4
*55	(03) 2,2	(01) 0,7
*56	(00) 0,0	(00) 0,0
*57	(12) 8,7	(03) 2,2
*58	(06) 4,4	(02) 1,4
*67	(00) 0,0	(00) 0,0
*73	(01) 0,8	(00) 0,0
*78	(01) 0,8	(00) 0,0
*81	(01) 0,8	(00) 0,0
*82	(01) 0,8	(00) 0,0

N: número de indivíduos; n: soma de cada alelo tipificado, descritos na tabela 26, apêndice 3, página 202; F (%)=(n/2N) x 100.

Tabela 15: Distribuição das frequências (%) dos alelos HLA-DRB1 e -DQB1 nos pacientes com psoríase e no grupo-controle de indivíduos sadios.

Psoríase			Controle		
Alelos HLA	N=69		Alelos HLA	N=69	
DRB1	(n) %	(n) %	DQB1	(n) %	(n) %
*01	(11) 8,0	(16) 11,5	*02	(22) 16,0	(24) 17,1
*03	(06) 4,4	(14) 10,0	*03	(53) 38,4	(56) 40,0
*04	(10) 7,3	(23) 16,4	*04	(05) 3,7	(03) 2,1
*07	(22) 16,0	(11) 7,9	*05	(24) 17,4	(24) 17,1
*08	(04) 2,9	(02) 1,4	*06	(21) 15,2	(28) 20
*09	(01) 0,8	(01) 0,7			
*10	(07) 5,1	(04) 2,9			
*11	(31) 22,5	(21) 15,0			
*12	(01) 0,8	(02) 1,4			
*13	(14) 10,2	(20) 14,3			
*14	(01) 0,8	(03) 2,1			
*15	(10) 7,3	(11) 7,9			
*16	(13) 9,5	(09) 6,4			
*17	(00) 0,0	0			
*18	(00) 0,0	0			

N: número de indivíduos; n: soma de cada alelo HLA tipificado; F (%)=(n/2N) x 100.

Após determinadas as frequências alélicas, foi feita a comparação entre as frequências de pacientes e grupo-controle de indivíduos sadios. Na tabela 16 e no

gráfico 1, estão evidenciados os alelos HLA classe I com significância estatística ($p < 0,05$ e $OR > 1$).

Tabela 16: Frequências alélicas (%) e significância estatística dos principais alelos HLA classe I e II no grupo de pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.

Alelos HLA	Psoríase N=69 (n) %	Controle N=70 (n) %	<i>p</i>	<i>pc</i>	OR	IC 95%
B*13	(07) 5,1	(01) 0,7	0,03	<i>ns</i>	9,03	1,09-74,35
B*37	(08) 5,8	(02) 1,4	0,04	<i>ns</i>	5,17	1,08-24,76
B*39	(10) 7,3	(03) 2,2	0,02	<i>ns</i>	4,35	1,17-16,13
B*57	(12) 8,7	(03) 2,2	0,006	<i>ns</i>	5,30	1,46-19,19
Cw*06	(36) 26,1	(14) 10,0	0,0001	0,0014	3,93	2,02-7,65
Cw*12	(22) 16,0	(08) 5,7	0,0016	0,02	3,84	1,65-8,93
DRB1*04	(10) 7,3	(23) 16,4	0,095	<i>ns</i>	0,49	0,23-1,09
DRB1*07	(22) 16,0	(11) 7,9	0,009	<i>ns</i>	2,74	1,28-5,87
DRB1*11	(31) 22,5	(21) 15,0	0,02	<i>ns</i>	2,05	1,12-3,77

N: número de indivíduos; n: soma de cada alelo tipificado; *p*: valor de *p*; *pc*: valor de *p* corrigido; OR : Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *ns*: não significante.

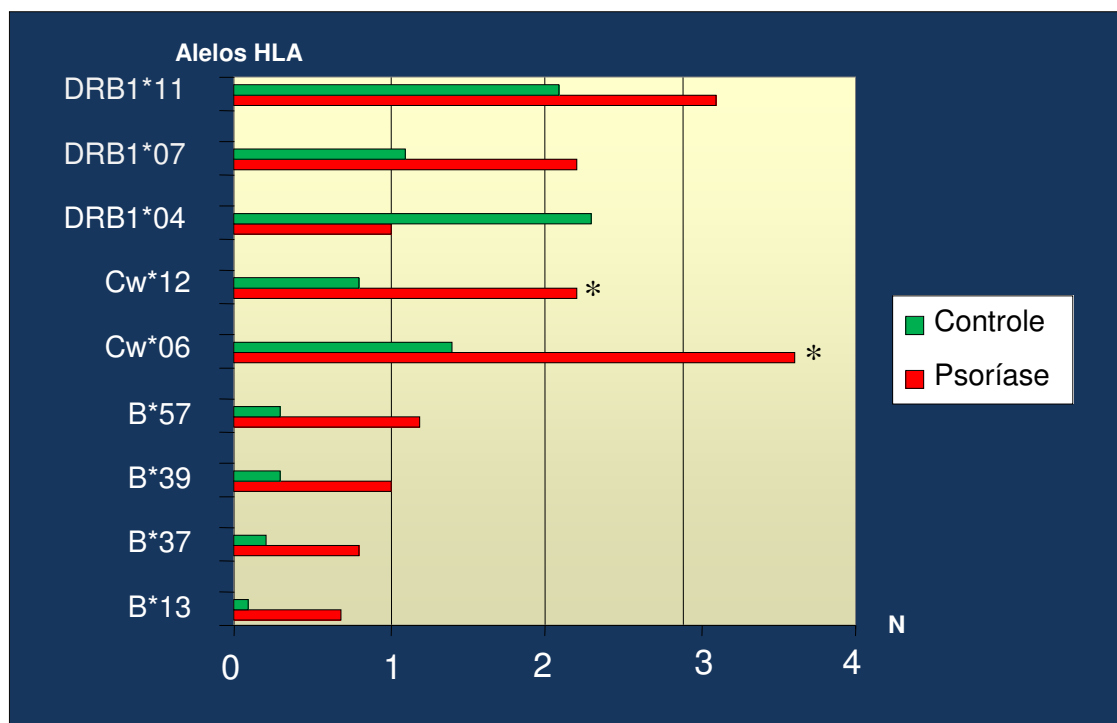


Gráfico 1: Frequências alélicas dos HLA classe I e II dos pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos saudáveis. * Alelos com significância estatística após correção do valor de p .

Apresentaram significância estatística os alelos HLA-B*57 ($p=0,006$; OR=5,3; IC95%=1,46-19,19), -Cw*06 ($p=0,0001$; OR=3,93; IC95%=2,02-7,65), -Cw*12 ($p=0,0016$; OR=3,84; IC95%=1,65-8,93) e -DRB1*07 ($p=0,009$; OR=2,74; IC95%=1,28-5,87). Estes alelos podem ser considerados fatores de risco genético para psoríase na população estudada, enquanto o alelo -DRB1*04 foi mais frequente no grupo-controle de indivíduos saudáveis, mostrando tendência à associação negativa com a doença ($p=0,095$; OR=0,49; IC95%=0,23-1,09) e podendo conferir proteção. Ao se aplicar a correção de Bonferroni, o valor de p deixou de ter significância estatística para a maioria dos alelos, com exceção dos alelos HLA-Cw*06 e -Cw*12. A distribuição das frequências alélicas e significância estatística dos principais alelos HLA classe I e II entre os grupos I, II e grupo-controle de indivíduos saudáveis está assinalada na tabela 17.

Tabela 17: Frequências alélicas (%) e significância estatística dos alelos HLA de classe I e II entre os diferentes grupos.

Alelos	GI	Controle	<i>p</i>	<i>pc</i>	OR	IC 95%
HLA	N=36 (n) %	N=70 (n) %				
B*57	(08) 11,1	(03) 2,2	0,008	<i>ns</i>	5,7	1,46-22,24
Cw*06	(17) 23,6	(14) 10,0	0,013	<i>ns</i>	2,78	1,28-6,04
Cw*12	(12) 16,7	(08) 5,7	0,013	<i>ns</i>	3,3	1,28-8,49
	GII	Controle				
	N=33 (n) %	N=70 (n) %				
B*13	(04) 6,1	(01) 0,7	0,037	<i>ns</i>	8,97	0,98-81,92
B*37	(07) 10,6	(02) 1,4	0,005	<i>ns</i>	8,18	1,65-40,59
Cw*06	(19) 28,8	(14) 10,0	0,001	0,01	3,64	1,68-7,83
Cw*12	(10) 15,1	(08) 5,7	0,03	<i>ns</i>	2,9	1,10-7,86
DRB1*04	(03) 4,5	(23) 16,4	0,02	<i>ns</i>	0,24	0,07-0,84
DRB1*07	(13) 19,7	(11) 7,9	0,02	<i>ns</i>	2,9	1,21-6,82
	GI	GII				
	N=36 (n) %	N=33 (n) %				
B*37	(01) 1,4	(07) 10,6	0,03	<i>ns</i>	0,12	0,014-0,093

N: número de indivíduos; n: soma de cada alelo tipificado; *p*: valor de *p*; *pc*: valor de *p* corrigido; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *ns*: não significante.

Quando comparado o grupo I e o grupo-controle de indivíduos sadios (tabela 17 e gráfico 2), o alelo HLA-B*57 foi mais frequente no grupo I. Entre o grupo II e o grupo-controle de indivíduos sadios (tabela 17 e gráfico 3), houve significância estatística para os alelos HLA-B*37 ($p=0,005$; OR=8,18; IC95%=1,65-40,59), -Cw*06 ($p=0,001$; OR=3,64; IC95%=1,68-7,83), -Cw*12 ($p=0,03$; OR=2,9; IC95%=1,10-7,86) e -DRB1*07 ($p=0,02$; OR=2,9; IC95%=1,21-6,82). Por fim, entre os grupos I e II, o alelo HLA-B*37 apresentou tendência à associação com o grupo II ($p=0,03$; OR=0,12; 0,014-0,093). Após a aplicação da correção de Bonferroni, apenas o alelo HLA-Cw*06 permaneceu com significância estatística e associado ao grupo II.

Assim, é possível sugerir que o alelo HLA-B*57 parece ser um marcador de doença mais branda, enquanto os alelos -B*37, -Cw*06, -Cw*12 e -DRB1*07 podem estar associados ao curso mais grave da psoríase.

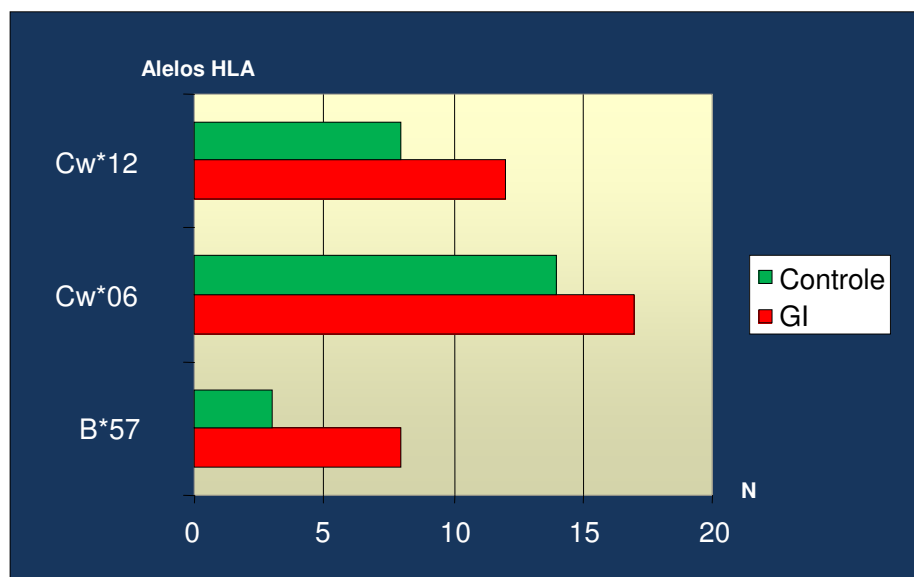


Gráfico 2: Frequências alélicas dos HLA classe I e II do grupo I (GI) e grupo-controle de indivíduos sadios.

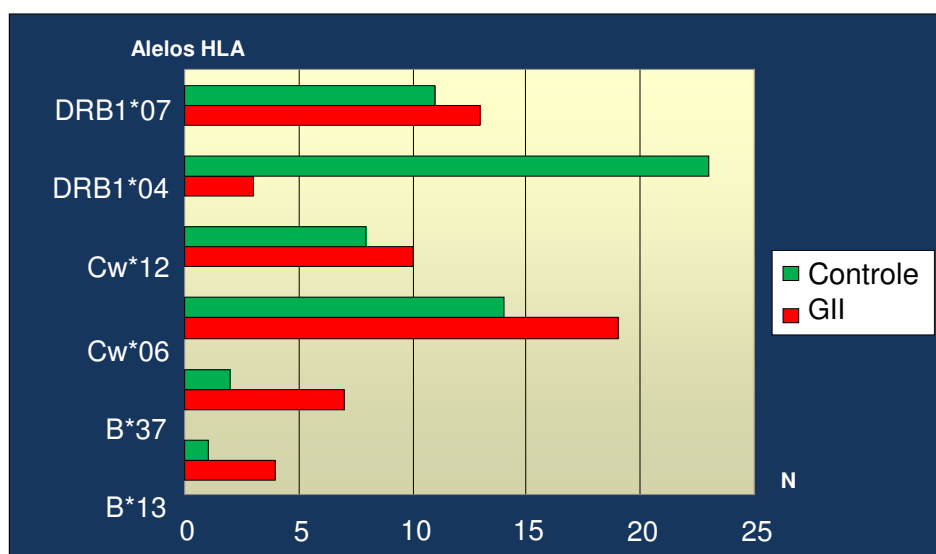


Gráfico 3: Frequências alélicas dos HLA classe I e II do grupo II (GII) e grupo-controle de indivíduos sadios.

4.3 - HLA e psoríase linear

A psoríase congênita é muito rara. A forma nevóide é descrita, não associada a outras lesões de psoríase. No grupo estudado, dois pacientes apresentaram lesões lineares no membro inferior, de aspecto psoriasiforme, desde as primeiras semanas de vida. O diagnóstico de psoríase linear foi confirmado pelo exame histopatológico. Na pré-adolescência, desenvolveram psoríase vulgar clássica, com boa resposta ao tratamento, voltando a manter apenas psoríase linear. Os haplótipos HLA de classe I destes dois pacientes foram: HLA-A*02; B*08 B*35; Cw*07 Cw*12 e HLA-A*03 A*01; B*58 B*27; Cw*07 Cw*02.

4.4 - Região promotora do TNF- α (SNPs -238 e -308)

As principais características clínicas dos pacientes foram agrupadas conforme o genótipo do TNF- α -238 e -308, como mostra a tabela 18.

Tabela 18: Características clínicas dos pacientes de acordo com o genótipo do TNF- α -238 e -308 e frequência (%) do evento em cada grupo.

	TNF- α -238		TNF- α -308		TOTAL
	GG	GA	GG	GA	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Idade (média, anos)	13,0	17,9	13,5	23,1	15,1
Mulheres	32 (66,7)	16 (76,2)	40 (70,2)	8 (66,7)	48 (69,5)
Homens	16 (33,3)	5 (23,8)	17 (29,8)	4 (33,3)	21 (30,5)
PV	38 (79,2)	18 (85,7)	45 (79,0)	11 (91,7)	56 (81,1)
PG	10 (20,8)	3 (14,3)	12 (21,0)	1 (8,3)	13 (18,9)
AP	5	0	2	3	5 (7,2)
Eritrodermia	3	0	3	0	3 (4,3)
Anti-TNF	6	0	6	0	6 (8,6)
AF+	18 (37,5)	12 (57,2)	27 (47,3)	4 (33,3)	31 (45,0)
AF-	30 (62,5)	9 (42,8)	30 (52,7)	8 (66,7)	38 (55,0)
GI	21 (43,8)	15 (71,5)	29 (50,9)	7 (58,4)	36 (52,2)
GII	27 (56,2)	6 (28,5)	28 (49,1)	5 (41,6)	33 (47,8)
TOTAL	48	21	57	12	69

N: número de indivíduos; PV: psoríase vulgar; PG: psoríase gutata; AP: artrite psoriásica; Anti-TNF: uso de terapia anti-TNF; AF+: antecedente familiar presente; AF-: antecedente familiar ausente; GI: grupo I de boa evolução clínica; GII: grupo II de evolução clínica desfavorável.

As frequências dos alelos G e A das regiões promotoras do TNF -238 e -308 e também dos genótipos GG, GA e AA foram calculadas (tabela 19 e gráficos 4 e 5).

Tabela 19: Distribuição dos alelos G e A e frequências dos genótipos GG e GA dos SNPs do TNF α -238 e -308 dos pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.

	Controles N=70	Psoríase N=69	<i>p</i>
TNF- α -238	n (%)	n (%)	
Genótipo			
GG	51 (72.8)	48 (69.5)	<i>ns</i>
GA	19 (27.2)	21 (30.5)	<i>ns</i>
AA	00 (0.0)	00 (0.0)	<i>ns</i>
Alelos			
G	121 (86.4)	117 (84.8)	<i>ns</i>
A	19 (13.6)	21 (15.2)	<i>ns</i>
TNF-α -308			
Genótipo			
GG	53 (75.7)	57 (82.6)	<i>ns</i>
GA	17 (24.3)	12 (17.4)	<i>ns</i>
AA	00 (0.0)	00 (0.0)	<i>ns</i>
Alelos			
G	123 (87.8)	126 (91.3)	<i>ns</i>
A	17 (12.2)	12 (8.7)	<i>ns</i>

N: número de indivíduos; n: soma de cada alelo tipificado; *p*: valor de *p*; *ns*: não significante.

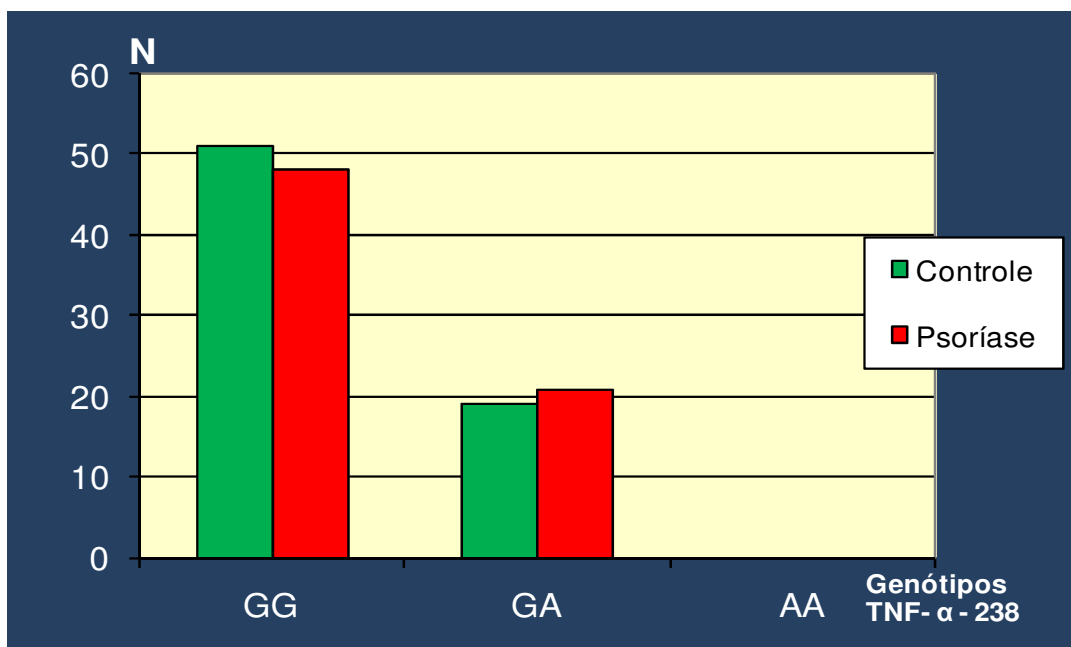


Gráfico 4: Frequências dos genótipos dos SNPs -238 do TNF- α do grupo total de pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.

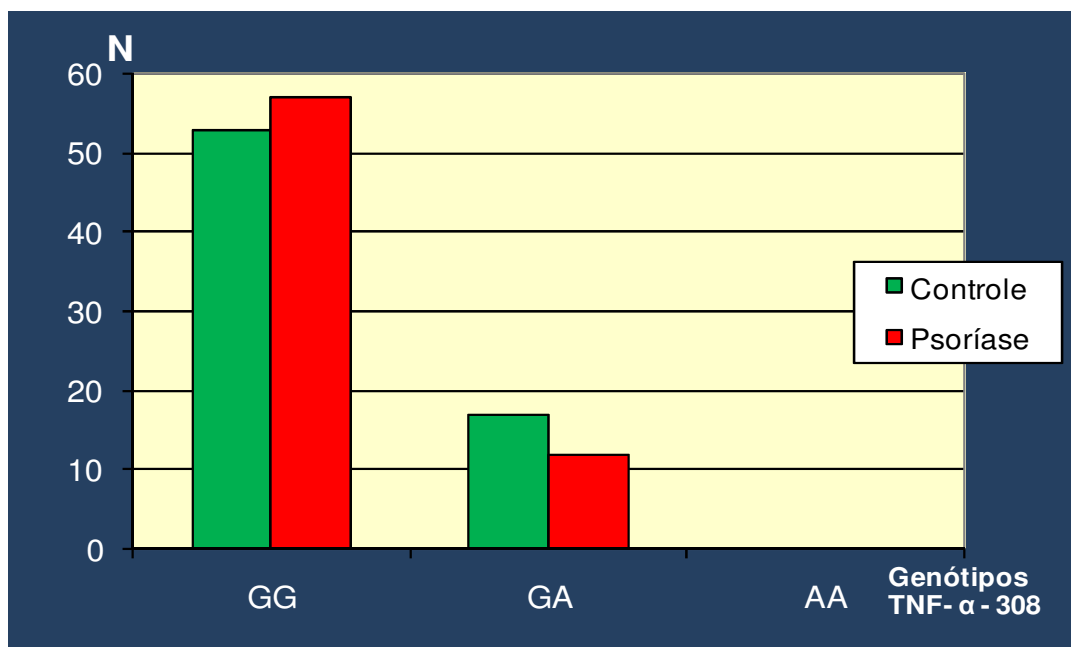


Gráfico 5: Frequências dos genótipos dos SNPs -308 do TNF- α do grupo total de pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios.

As frequências alélicas e genotípicas dos pacientes e dos indivíduos sadios do grupo-controle foram avaliadas através do Odds Ratio (tabela 20).

Tabela 20: Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do TNF- α -238 e -308, entre grupo I (GI) e II (GII) e significância estatística.

	GI N=36 n (%)	GII N=33 n (%)	<i>p</i>	OR	IC 95%
Genótipo TNFα -238					
GG	21 (58,3)	27 (81,8)	0,04	3,21	1,06 - 9,71
GA	15 (41,7)	06 (18,2)	<i>ns</i>	-	-
AA	00 (0,0)	00 (0,0)	-	-	-
Alelos					
G	57 (79,2)	60 (90,9)	0,06	2,63	0,95 - 7,25
A	15 (20,8)	06 (9,1)	<i>ns</i>	-	-
Genótipo TNFα -308					
GG	29 (80,5)	28 (84,8)	<i>ns</i>	-	-
GA	07 (19,5)	05 (15,2)	-	-	-
AA	00 (0,0)	00 (0,0)	-	-	-
Alelos					
G	65 (90,3)	61 (92,4)	<i>ns</i>	-	-
A	07 (9,7)	05 (7,6)	-	-	-

N: número de indivíduos; n: soma de um alelo específico; *p*: valor de *p*; OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *ns*: não significante.

Não se observou diferença estatística entre o grupo de pacientes e grupo-controle de indivíduos sadios neste estudo. Considerando o genótipo TNF- α -238 G/G, houve diferença com significância estatística entre os grupos GI e GII ($p=0,04$; OR=3,21; IC95%=1,06-9,71). Aparentemente, a presença do alelo G no *locus* da região promotora do TNF- α -238 está associado a pior prognóstico da doença.

4.5 - Reconstrução do haplótipo estendido TNF- α -238/-308

Os métodos ELB e PHASE estimaram a composição do alelo TNF- α de cada amostra com média de probabilidade de 0,975 e 0,974, respectivamente. Dos 139 indivíduos submetidos à reconstrução computacional, apenas 6,5% não tiveram sua constituição de haplótipo mais provável reconstituída com probabilidade maior de 99%. Apenas seis (4,3%) indivíduos tiveram seu mais provável haplótipo inferido com probabilidade de menos de 80%. Afora isso, todas as amostras tiveram a mesma combinação de haplótipos determinada por ambos os métodos, ELB e PHASE, o que demonstra que estes são métodos de alta

precisão para estimativa de reconstrução haplotípica. As relações dos haplótipos dos pacientes e grupo-controle de indivíduos sadios estão nas tabelas 28 e 29 (apêndice 3).

Abaixo relacionadas na tabela 21 estão as frequências dos haplótipos do TNF -238 e -308 reconstruídos computacionalmente. Não houve significância estatística ao se compararem os grupos GI, GII e grupo total de pacientes com o grupo-controle de indivíduos sadios.

Tabela 21: Distribuição dos haplótipos TNF- α -238 e -308 e frequências haplotípicas (%) entre grupo total, grupo I (GI) e II (GII) de pacientes e grupo-controle de indivíduos sadios.

Haplótipos	Psoríase	Controles	<i>p</i>
	N=69 2n=138 (%)	N=70 2n=140 (%)	
-238A-308A	0 (0,0)	3 (2,1)	<i>ns</i>
-238A-308G	21 (15,2)	16 (11,4)	<i>ns</i>
-238G-308A	12 (08,7)	14 (10,0)	<i>ns</i>
-238G-308G	105 (76,1)	107 (76,4)	<i>ns</i>
GI			
	N=36 2n=72 (%)		
-238A-308A	0 (0,0)	3 (2,1)	<i>ns</i>
-238A-308G	15 (20,8)	16 (11,4)	<i>ns</i>
-238G-308A	7 (9,7)	14 (10,0)	<i>ns</i>
-238G-308G	50 (69,4)	107 (76,4)	<i>ns</i>
GII			
	N=33 2n=66 (%)		
-238A-308A	0 (0,0)	3 (2,1)	<i>ns</i>
-238A-308G	6 (9,1)	16 (11,4)	<i>ns</i>
-238G-308A	5 (7,6)	14 (10,0)	<i>ns</i>
-238G-308G	55 (83,3)	107 (76,4)	<i>ns</i>
GI			
	N=36 2n=72 (%)		
-238A-308A	0 (0,0)	0 (0,0)	<i>ns</i>
-238A-308G	15 (20,8)	6 (9,1)	<i>ns</i>
-238G-308A	7 (9,7)	5 (7,6)	<i>ns</i>
-238G-308G	50 (69,4)	55 (83,3)	<i>ns</i>

N: número de indivíduos; 2n: soma de um alelo específico multiplicado por dois; *p*: valor de *p*; *ns*: não significante.

Ao se comparar o grupo I com o grupo-controle de indivíduos sadios, observa-se uma tendência de associação do haplótipo TNF- α -238A-308G com o grupo I ($p=0,09$; OR=2.03; IC95%=0,94-4,41). Do mesmo modo, ao se comparar o grupo I com o grupo II, encontra-se uma tendência de associação deste haplótipo com o grupo de doença leve ($p=0,06$; OR=2,63; IC95%=0,95-7,25).

5 – DISCUSSÃO

A psoríase é doença inflamatória crônica que não se limita à pele e às articulações, interfere na qualidade de vida e associa-se a várias comorbidades. É influenciada por fatores desencadeantes ambientais, como infecções, traumas cutâneos e desordens emocionais, mas a susceptibilidade genética é a base para o desenvolvimento da doença. Apesar da complexidade do componente genético, há métodos para a identificação de genes associados a esta susceptibilidade. O sistema HLA está essencialmente envolvido na sua patogênese (111) e o TNF- α é uma das citocinas determinantes para a ocorrência das lesões (3), o que justifica o estudo destes genes relacionados.

5.1 - Indivíduos participantes da pesquisa

A população brasileira é considerada mista, resultante da mistura de várias raças, principalmente caucasóides descendentes, africanos descendentes e ameríndios. A cor da pele não é bom indicador de ancestralidade (174, 175). Mesmo indivíduos com fenótipo caucasóide podem ter genes ancestrais de outras raças. Um estudo do Rio Grande do Sul caracterizou a ancestralidade de amostras de indivíduos de fenótipo tipicamente caucasóide daquele estado. Observaram indivíduos com marcadores genéticos de ameríndios em 36% e africanos em 16% (176).

Questiona-se se populações mistas são adequadas para estudos imunogenéticos, mas é necessário admitir que ao longo do tempo uma identidade genética define-se e precisa ser estudada, caracterizada e divulgada, para melhor compreensão da relação entre marcadores genéticos e doenças nas diferentes populações.

5.2 - Manifestações clínicas da psoríase e evolução da doença

Neste estudo, a média de idade de aparecimento dos sintomas foi em torno de 15 anos, consistente com os dados publicados. Henseler e Christophers (13) relataram uma distribuição bimodal da idade de aparecimento da doença: um pico entre 16 e 22 anos e outro entre 57 e 60 anos. Lamholt *apud* Griffiths et al. (8),

sobre a ocorrência da doença em Faroe Island, notou média de idade de aparecimento da doença de 12,5 anos. Em contraste, análises de povos asiáticos mostram média de 36 anos (177). Já o estudo americano de Farber e Nall (9), com 5.600 pacientes, encontrou média de idade aproximada de 28 anos; destes 10% com aparecimento antes de 10 anos, 35% antes de 20 anos e 58% antes de 30 anos. Nas populações em que a prevalência da doença é alta, nota-se que a idade de surgimento é menor. Todos os estudos demonstram que os casos de aparecimento de psoríase em idade precoce tendem a curso mais grave.

Houve número maior de mulheres (69,5%) neste grupo, embora a prevalência da doença seja igual em ambos os sexos, segundo a literatura. A psoríase tem um grande impacto na qualidade de vida e afeta a socialização para homens e mulheres igualmente (178), mas, no presente estudo, doença grave foi mais frequente nos pacientes masculinos. Em várias doenças, a associação entre manifestação clínica e HLA é diferente entre os sexos. Por exemplo, um estudo com crianças com espondilite anquilosante mostrou que 80% dos homens e apenas 20% das mulheres apresentavam o alelo HLA-B27 e a doença era mais grave nos homens (179). Em pacientes com uveíte anterior aguda, HLA-B27 foi associado com sintomas sistêmicos de doença reumatológica mais frequente e precocemente em homens do que em mulheres (180). Estudo brasileiro com artrite psoriática mostrou a predominância do sexo masculino, em 59,8% dos casos, ausência do HLA-B27 em 79,4%, mas o subgrupo de homens com espondilite mostrou-se associado com HLA-B27 (181).

Não houve diferença na frequência de HLA-Cw*06 ou outro alelo HLA entre homens e mulheres neste estudo, mas houve uma tendência à associação do genótipo TNF- α -238 G/A, mais frequente no grupo feminino e mais relacionado à doença branda. Interação entre sexo e imunogenética pode influenciar a susceptibilidade à psoríase e outras doenças, devido às diferenças hormonais ou cromossômicas, o que não é esclarecido.

A psoríase vulgar foi encontrada em aproximadamente 81% dos casos, consistente com a literatura. Psoríase gutata foi mais observada no grupo de evolução desfavorável, sendo que esta forma é classicamente associada às

infecções bacterianas e é considerada benigna e autolimitada. No grupo estudado, 11 dos 13 pacientes com a forma gutata apresentaram evolução para placas crônicas extensas, sendo que um caso desenvolveu eritrodermia e dois necessitaram de tratamento anti-TNF para controle das lesões.

O acometimento renal na psoríase é raro. Há descrições de glomerulonefrite pós-estreptocócica, glomerulonefrite mesangiocapilar e amiloidose renal (62, 63). Uma paciente de 60 anos, dislipidêmica e diabética, com psoríase eritrodérmica sem resposta a outros tratamentos, iniciou uso de etanercept. Logo após o início da terapia anti-TNF, evoluiu com proteinúria nefrótica, que regrediu com a retirada da droga. O exame histopatológico do rim mostrou glomerulonefrite mesangioproliferativa. Pode-se caracterizar mais uma descrição da nefropatia psoriática². Não há referências sobre o fato do etanercept piorar a função renal destes pacientes.

Observa-se que, entre os pacientes que iniciaram a doença até dez anos de idade, a maioria faz parte do grupo I, enquanto a maior parte do grupo II iniciou a doença na adolescência. Sob este aspecto têm importância os fatores desencadeantes. No grupo II, 72,7% dos casos apresentaram fatores desencadeantes, principalmente relacionados aos eventos estressantes (exames, acidentes, desagregação familiar, atentados sexuais e morte), contra 55,5% do grupo I.

Foram observados casos familiares em 45% dos pacientes estudados, enquanto a literatura refere-se a 30% aproximadamente. Maior associação familiar foi encontrada no grupo de pior prognóstico (57,6%).

Recorrência é a regra na psoríase. Desde as citações de Hebra *apud* Griffiths et al. (8) até os dias atuais, é imprevisível o tempo livre de doença. As análises de Farber e Nall (9), apontam remissões de um a 54 anos, mesmo sem tratamento, em 39% dos pacientes estudados. Remissões persistentes podem ser obtidas através de terapias prolongadas.

² Caso clínico do Ambulatório de Psoríase da Disciplina de Dermatologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP; em vias de publicação.

Neste estudo, dentro do grupo I, houve 16 casos (23,1%) de remissão após o tratamento tópico.

5.3 - Psoríase Linear

Esta forma é rara, assim como descrições isoladas de psoríase verdadeira distribuída em faixas lineares ou nas linhas de Blaschko (182, 183).

Psoríase em desenho linear pode ocorrer através de fenômeno de Koebner e a forma nevóide tem sido descrita. Entre os diagnósticos diferenciais incluem-se invasão de um nevo epidérmico por psoríase através de fenômeno isomórfico e o próprio nevo inflamatório (NEVIL de nevo epidérmico verrucoso inflamatório linear) (182, 184).

Há várias descrições de pacientes com lesão psoriática linear desde os primeiros dias de vida que desenvolvem psoríase vulgar clássica, respondem ao tratamento, voltando a apresentar lesão neviforme. Também há casos de psoríase linear que se dissemina seguindo linhas de Blaschko (183).

Um estudo de 23 casos revelou predomínio de distribuição unilateral, nas pernas, coxas e glúteos, aparecimento até os seis meses de vida, e predomínio no sexo masculino em 16 pacientes (185). Ambos os casos deste trabalho apresentavam lesões nos membros inferiores e tiveram outras lesões psoriáticas que responderam ao tratamento, enquanto a lesão nevóide persistiu e pouco se modificou apesar das várias modalidades terapêuticas empregadas, quais sejam corticóides tópicos, oclusivo e intra-lesional, calcipotriol, coaltar, tretinoína e crioterapia.

Nenhum dos pacientes eram portadores dos HLAs associados à doença de aparecimento precoce como -B*13 e -Cw*06. Mosaicismo genético visualizado pelas linhas de Blaschko é um conceito bem estabelecido, em que certo grupo de células reagem diferentemente das demais, por anormalidades cromossômicas (186). Sendo assim, a presença de psoríase linear desde o nascimento não parece ter necessariamente associação com os alelos HLA do indivíduo, mas pode estar mais relacionado a fenômenos cromossômicos localizados. Não há

dados na literatura até o momento que mostrem uma relação entre psoríase linear ou psoríase congênita e alelos HLA de classe I (160).

5.4 - Alelos HLA classe I e II

Em 1980, o HLA Cw*06 foi reconhecido como o alelo mais relacionado à psoríase (187) e, desde então, estudos em diferentes populações mostram associações com HLA. Brenner (188) descreveu a relação entre psoríase com HLA-B13, B17, B37 e Cw6. Elder et al. (111) relacionaram os antígenos de classe I HLA-A1, -A2, -B13, -B37, -B39, -B57, -Cw6, -Cw7, e os antígenos de classe II HLA-DR7, -DR10, -DQ9, com a psoríase.

A associação é mais intensa com alelos HLA classe I, embora haja descrição da contribuição dos alelos de classe II, como HLA-DRB1*0701 e -DRB1*1401, em grupo de 76 pacientes taiwaneses (189) e -DRB1*0102 e -DRB3*02, em estudo brasileiro com 60 casos, além de uma associação negativa com -DRB4*01 e -DRB1*1302 (190).

No presente estudo, os alelos que apresentaram tendência de associação com psoríase na população estudada foram: HLA-B*13, -B*37, -B*39, -Cw*06, -Cw*12, DRB1*07 e DRB1*11, sendo que apenas o -Cw*06 e -Cw*12 mantiveram diferença com significância estatística dos indivíduos normais após a correção do valor de *p*. Quanto às formas de apresentação clínica da doença, o alelo HLA-Cw*06 esteve presente em 61,5% dos pacientes com psoríase gutata e em 50% com psoríase vulgar, sendo que os três casos desencadeados por infecções apresentavam este alelo, dois deles evoluíram com placas crônicas e um com remissão da doença. Um estudo psoríase gutata, após infecções estreptocócicas de vias aéreas, mostrou 100% de associação com HLA-Cw*06 (191). Evidências mostram que ocorre reação cruzada entre os antígenos do estreptococo e elementos da epiderme que se ligam preferencialmente à fenda de ligação de antígeno HLA-Cw*06 (192). Isto pode explicar a alta frequência deste alelo nesta forma clínica.

O HLA-Cw*06 é associado à artrite psoriática, assim como os alelos HLA-B*27, -B*38 e -B*39 (193), sendo o -B*27 mais ligado à forma axial da doença (180). Estes alelos têm associação com a doença, independente do HLA-Cw*06.

Dois casos que evoluíram com artrite psoriática ao longo do seguimento apresentaram os alelos HLA-B*27, embora não tenham desenvolvido espondilite, mas oligoartrite assimétrica. Na artrite psoriática, os casos familiares não são comuns como na psoríase cutânea. Foi reportado associação com um *locus* de susceptibilidade no cromossomo 16q (194). Maior prevalência de artrite é vista em pacientes psoriáticos portadores do vírus HIV (195), da hepatite C (196) e na presença de antígenos bacterianos (197).

O acometimento ungueal pela psoríase, que ocorreu em 58% dos pacientes, mostrou frequência maior dos alelos HLA-B*13, -B*37, -B*39, -Cw*06 e -Cw*12, sendo que -Cw*06 foi encontrado em 50% dos casos.

Lesões mucosas foram observadas em 12 pacientes, cinco (41,6%) com HLA-Cw*06. Há associação entre psoríase e língua geográfica, entidades com aspectos histológicos semelhantes e maior incidência do alelo HLA-Cw*06 (49). Não houve associações específicas entre as várias manifestações clínicas da psoríase e os alelos HLA.

Observou-se que o alelo HLA-Cw*12 representou risco genético para a psoríase e foi mais prevalente no grupo de pacientes com início precoce da doença. Não há na literatura consultada até o momento este registro. Informações como esta poderiam ser úteis no acompanhamento destes pacientes que desenvolvem a doença com pouca idade.

Eritrodermia foi observada em três pacientes, sendo que dois apresentaram o alelo HLA-Cw*06. Não houve casos de psoríase pustulosa nesta amostra, mas existe forte correlação com HLA-B*27 (199) e poliartrite é comum nesta forma de psoríase.

Quanto à evolução e prognóstico, o presente estudo sugere que o alelo HLA-B*57 está associado a doença branda, enquanto os alelos HLA-B*13; -B*37, -Cw*06, -Cw*12 e -DRB1*07 estão relacionados a doença mais grave, com destaque para -Cw*06 e -Cw*12 que apresentaram significância estatística, o que

também foi encontrado em outros trabalhos brasileiros (135, 159). Ao se comparar o grupo I com o grupo II, o alelo HLA-B*37 foi mais frequente no segundo grupo e é possível interpretá-lo como um fator de mau prognóstico.

Analizando a dificuldade de tratamento sistêmico de alguns pacientes do grupo II que não responderam ao metotrexate, acitretina e PUVA, foi introduzido etanercept, uma terapia biológica anti-TNF- α . Ao todo, foram seis casos, sendo que 66,6% apresentavam HLA-Cw*06 e -Cw*12.

Na população brasileira, há poucos estudos de associação. Não se encontrou associação entre psoríase do tipo II (início após 40 anos) e HLA classe I.

Os alelos HLA de classe II HLA-DRB1*11 e -DRB1*07 foram relacionados ao risco de desenvolver a doença, enquanto o alelo HLA-DRB1*04 teve tendência a uma associação negativa, podendo conferir proteção.

O PSORS1 é identificado consistentemente em vários estudos como o principal fator de susceptibilidade à psoríase (106, 200). Está localizado no MHC (6p21.3), que contém genes HLA e mais 200 outros. O HLA-Cw*06, e outros alelos que estão em desequilíbrio de ligação como o HLA-B*13, representam um alto risco relativo para psoríase. Seu papel é importante na patogênese da doença, pois O HLA-C apresenta antígenos aos linfócitos CD8+, que estão em número aumentado na lesão psoriática. Em populações asiáticas, outros alelos mostraram-se importantes, como HLA-Cw01 e -B46 (201).

Estudos sugerem que o PSORS1 reside telomérico ao HLA-B entretanto, não se pode afirmar que é o HLA-C. A identificação do gene causador neste *locus* é dificultada pelo desequilíbrio de ligação extenso, entretanto as evidências sugerem um evento próximo ou dentro do HLA-C como o fator de susceptibilidade à psoríase (106). Dez genes encontram-se no intervalo em questão e alguns estão relacionados à psoríase, mas os estudos não mostraram uma associação independente do HLA-C.

Uma revisão sobre os alelos HLA encontrados em diversas populações mostra que os alelos mais reportados, independente da população estudada, foram Cw*0602 e DRB1*0701, o que é consistente com o encontrado em nossa

análise. Por outro lado, alelos com efeito protetivo não são muito reportados e diferem nas diversas populações (202) (anexo 1).

Um trabalho do nosso grupo, por técnica sorológica, encontrou frequência aumentada com significância estatística dos antígenos HLA-A1, -A2, -B13, -B35, -B57, -Cw6, -Cw7, -DR7 e -DQ5, associados à doença de início precoce (203). Baseado na observação de que vários pacientes evoluíram com remissão espontânea, comparados com outros que progrediram para doença crônica, surgiu a idéia de investigar marcadores imunogenéticos envolvidos com a evolução e prognóstico. Assim, um estudo com 31 crianças que desenvolveram psoríase até 18 anos e tiveram um período longo de seguimento foi elaborado. Observou-se boa evolução, quando comparados pacientes e controles, associada aos alelos HLA-B*13, -B*39, -B*55, -Cw*06 e -Cw*12, enquanto a evolução desfavorável foi relacionada aos alelos HLA-B*13, -B*37, -Cw*06, -Cw*12. Ao se compararem os dois grupos, o alelo -B*37 destacou-se como um marcador de mau prognóstico (159).

5.5 - SNPs do TNF- α -238 e -308

Considerando as diferenças clínicas, a média de idade para o início da doença foi mais alta para os pacientes com genótipo -308 G/A, em torno de 23 anos. Os casos de artrite foram associados ao genótipo -308 G/A (três de cinco casos), o que é descrito, e todos apresentaram -238 G/G. A maior parte dos casos de psoríase gutata foi relacionada ao genótipo -238 G/G e -308 G/G. Todos os pacientes que evoluíram com eritrodermia, assim como os que necessitaram de terapia anti-TNF, apresentaram genótipos -238 G/G e -308 G/G. As associações com formas graves da doença foram com o alelo G e não se observou a associação do genótipo -308 G/A com o grupo I, sendo que a literatura atribui um efeito protetivo a este marcador.

Não se observou significância estatística nas diferenças entre o grupo total de pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos sadios neste estudo considerando alelos, genótipos e haplótipos da região promotora do TNF- α -238 e

-308. Assim, este não parece ser um fator de risco mais importante do que o já estabelecido HLA-Cw*06 na população estudada.

Entretanto, este estudo apontou uma alta frequência do genótipo TNF- α -238 G/G, assim como do alelo -238 G, no grupo com doença mais grave. O contrário é verdadeiro e pode-se afirmar que o genótipo -238 G/A, assim como o alelo -238 A, estão em frequência maior no grupo de doença mais branda. No estudo dos haplótipos, esta mesma tendência foi observada com o haplótipo -238A-308G, encontrado em frequência reduzida no grupo de pior evolução, revelando um efeito protetor.

Polimorfismos na região promotora de TNF- α afetam a produção desta citocina, embora sua consequência funcional seja controversa. A secreção de TNF- α é principalmente regulada pelo nível transcricional e existem diferenças inter-individuais neste processo geneticamente determinadas, que têm sido relacionadas com haplótipos HLA-DR e polimorfismos na região promotora do TNF- α (204).

Estudo da população polonesa com 166 pacientes com psoríase vulgar e 65 controles demonstrou a associação com o polimorfismo da região promotora -238 G/A nos pacientes com início da doença antes de 40 anos e concluiu que este achado contribui não só para predisposição, mas para o fenótipo da doença. O alelo -308A estava diminuído em relação aos controles (205). Entretanto, em outra publicação sobre esta população, o polimorfismo da região -308 não foi significativamente associado à psoríase (206). No presente estudo, o genótipo -238 A/G esteve relacionado à doença mais branda, o que pode significar influência sobre o fenótipo.

Uma meta-análise avaliou publicações de estudo caso-controle, somando 997 pacientes com psoríase e 943 controles que foram estudados para o polimorfismo TNF-238 G/A e 1.156 pacientes e 1.083 controles que foram estudados para o polimorfismo -308 G/A. Concluiu que existe risco significativamente aumentado para o genótipo -238 G/A e A/A para o desenvolvimento de psoríase, enquanto o genótipo -308 G/A e A/A está relacionado a risco diminuído (207).

O grupo alemão defende que o alelo TNF- α -238*A é associado à psoríase vulgar na população caucasiana, enquanto o -308*A pode ter um efeito protetor estando associado à doença mais leve. Já na artrite psoriática, o alelo TNF- α -308*A está diminuído e, quando presente, é associado à doença mais grave (208).

Os resultados deste trabalho não correspondem ao que é descrito para a população caucasiana, considerando que a população brasileira é mista e que esta é a primeira consideração sobre os SNPs do TNF- α na psoríase nesta amostra. Este achado pode estar relacionado à descendência dos ameríndios, aproximando os nossos resultados aos da população asiática. Para comparar, um estudo de meta-análise de 21 trabalhos concluiu que o polimorfismo -308 A/G pode conferir susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico em europeus, mas não em asiáticos ou africanos (209).

Outro trabalho do nosso grupo, seguindo a tendência de se estudarem outros genes ligados ao MHC com participação na patogênese da psoríase, mostrou a associação de alelos e haplótipos do HLA classe I e polimorfismos dos microssatélites do TNF- α . Os resultados sugerem risco aumentado para a doença de surgimento até 40 anos para os haplótipos HLA-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06 e HLA-B*39 Cw*12. O haplótipo TNFa2 b1 c2 d4 e1 mostrou frequência diminuída com significância estatística nos pacientes com psoríase (135). De acordo com a idade de início da doença e evolução clínica, foi possível identificar um haplótipo estendido, HLA B*57 Cw*06 TNFa2b5c2d4e3 (AH57.1) em pacientes com início da doença antes dos 40 anos e com tendência a evolução clínica desfavorável (210). Estas associações sugerem risco genético para psoríase em pacientes brasileiros.

Os polimorfismos -238G/A e -308G/A influenciam a transcrição do gene TNF- α e têm sido implicados como fatores de risco genético para psoríase, embora os estudos sejam conflitantes. Estes dados devem ser avaliados nas diferentes etnias e podem ser utilizados como biomarcadores para estimativa de risco na psoríase (207).

5.6 - Biomarcadores, aplicação para os alelos HLA e SNPs do TNF- α

Podem ser considerados biomarcadores citocinas, células do infiltrado inflamatório, fatores transcripcionais e de ativação, SNPs, expressão de HLA-DR, entre outros. São marcadores para diagnóstico, atividade da doença, prognóstico e resposta ao tratamento (211).

O intuito de se estudarem particularidades genéticas da psoríase e de outras doenças é encontrar aplicação prática destes dados para melhorar a abordagem do paciente. Polimorfismos dos genes HLA classe I e II e dos SNPs do TNF- α podem ser considerados biomarcadores para prognóstico ou resposta terapêutica. As associações clínicas com o alelo HLA-Cw*06 permitem considerá-lo biomarcador destas características, quais sejam, início precoce da doença, crises de erupção gutata associada ao estreptococo, exacerbação da doença em casos de infecções de vias aéreas e melhor resposta à radiação ultravioleta.

Por exemplo, seria interessante determinar quais pacientes teriam chances maiores de se beneficiar da terapia biológica com inibidores do TNF- α . Este tratamento é de alto custo e apresenta vários efeitos colaterais, principalmente a imunossupressão e o risco de tuberculose. É altamente eficaz na artrite reumatóide, mas aproximadamente 30 a 40% dos pacientes não têm boa resposta ao tratamento.

Seitz et al. descreveram 54 pacientes com doença reumatológica (artrite psoriática, artrite reumatóide e espondilite anquilosante) em tratamento com infliximab, e concluíram que os pacientes com genótipo TNF- α -308 G/G apresentaram melhor resposta ao tratamento do que os genótipos A/A e A/G (212). Outra publicação de 59 pacientes com artrite reumatóide que foram divididos em dois grupos (genótipo -308 AA/GA e GG) mostrou que 42% dos pacientes do primeiro grupo evoluíram com melhora da doença articular após 22 semanas de infliximab contra 81% do segundo grupo, portanto inferindo que a genotipagem da região promotora pode sugerir se o paciente deve ter boa resposta ao tratamento ou não (213). Análise semelhante foi realizada com etanercept em 86 pacientes com artrite reumatóide que foram avaliados quanto à resposta da doença articular. Os pacientes com genótipo G/G na região promotora

do TNF- α -308 mostraram mais de 80% de chance de boa resposta contra menos de 50% com genótipo G/A (214). O mesmo foi observado com adalimumab em investigação do Chile com 81 pacientes de artrite reumatóide (215).

Neste trabalho, todos os pacientes que não responderam a outros tratamentos sistêmicos e necessitaram de terapia biológica apresentaram genótipos -238 G/G e -308 G/G, e tiveram boa resposta, evoluindo com a resolução de mais de 90% das lesões.

5.7 - Influência de fatores ambientais

Poucos fatores ambientais podem realmente desencadear psoríase, enquanto a maioria deles pode exacerbá-la ou modificá-la.

O fator de risco ambiental mais conhecido é a infecção de vias aéreas superiores, notadamente das amígdalas, por *Streptococcus sp.*, que pode desencadear a forma gutata (216) ou exacerbar a forma crônica de placas (217). A primeira descrição de psoríase gutata e faringite foi em 1916 por Winfield *apud* Gudjonsson e Elder (11) e desde então sucessivos estudos corroboram este evento. Já associação de infecção estreptocócica da pele e psoríase é pouco reportada, embora admita-se que colonização pode influenciar a doença.

Psoríase gutata é altamente associada ao HLA-Cw*06 (191). Foram identificados epítomos da proteína M do estreptococo que é estruturalmente homóloga às chamadas queratinas hiperproliferativas K16 e K17 e que se ligam preferencialmente à fenda de ligação de antígeno do Cw6. O HLA-Cw*06 eficientemente apresenta peptídeos derivados do estreptococo (proteína M), para linfócitos T de memória CD8+ da pele, e também peptídeos proteína M-símile derivados de K16 e K17. Baseado nestes achados, acredita-se que psoríase gutata é provocada por uma reação cruzada dos linfócitos T ativados por infecção estreptocócica da amígdala, enquanto psoríase crônica em placas é mantida por linfócitos T autorreativos que continuam a responder a peptídeos de queratina mesmo após a infecção estreptocócica ser clareada (192).

Não há aumento da prevalência da doença em pacientes com HIV, mas este é um fator que pode estar relacionado à exacerbação, como um agente

modificador (218). Com o avanço da imunodeficiência, o quadro fica mais grave e tende à remissão na sua fase terminal. Este fato é atribuído à perda da função regulatória das células CD4+ e o aumento da atividade de células CD8+ (219).

Várias drogas podem desencadear ou exacerbar a psoríase, como sais de lítio, antimaláricos, agentes beta-bloqueadores, anti-inflamatórios não-hormonais, inibidores da enzima conversora de angiotensina, genfibrozil, interferon α and γ e imiquimod, por mecanismos desconhecidos (11). A retirada da corticoterapia sistêmica constitui o principal fator para o agravamento do quadro clínico, podendo levar a doença à instabilidade e evoluir para eritrodermia ou pustulose generalizada (220). Uma grande análise caso-controle do Reino Unido avaliou 36.702 casos no momento do diagnóstico de psoríase e concluiu que beta-bloqueadores ou outros anti-hipertensivos não estão associados com o risco aumentado da doença (221), embora haja controvérsia sobre o assunto.

A influência dos hormônios na psoríase não é bem estabelecida, mas sabe-se que puberdade e gravidez podem mudar o estado da doença, em geral, para melhor (222).

A radiação ultravioleta (UV) é um potente agente terapêutico comumente utilizado para o tratamento de psoríase. Exposição a níveis elevados de radiação UV pode suprimir os linfócitos T da pele. Entretanto, exposição exagerada ao sol pode exacerbar a doença em uma minoria de pacientes por fenômeno isomórfico ou fotossensibilidade (223).

Estilo de vida e hábitos influenciam as manifestações da psoríase. Obesidade não é um desencadeante mas está associada a doença mais grave. A perda de peso facilita o controle da doença, o que foi observado em pacientes psoriáticos obesos submetidos à cirurgia de *bypass* (224, 225).

A dieta pode ter um papel modificador na doença. Ácidos graxos poli-insaturados, glúten e álcool podem levar à exacerbação (226). Um estudo demonstrou melhora das lesões com uma dieta de baixa caloria em quatro semanas (227). Acredita-se que mudanças nos níveis de hormônios metabólicos como grelina e leptina podem induzir esta melhora, devido ao seu potencial de liberar mediadores pró-inflamatórios como TNF- α (228).

Ácidos graxos poli-insaturados têm sido associados a várias doenças inflamatórias e autoimunes devido ao aumento da produção de eicosanóides do ácido araquidônico (AA), mas os estudos sobre dietas baseadas neste princípio são inconsistentes. Dietas hipocalóricas levam à melhora dos sintomas da psoríase vulgar, embora não se conheça o mecanismo responsável por esse efeito (229). Acredita-se que a diminuição do ácido araquidônico resulta em menor produção de eicosanóides inflamatórios. Durante o jejum, ocorre aumento da participação da IL-4, anti-inflamatória, e redução do estresse oxidativo (230). Assim, dieta vegetariana ou a substituição dos AA por outros ácidos graxos como o eicosapentaenóico (EPA), que usam a mesma via enzimática de metabolização, podem ser utilizados como recurso terapêutico adjuvante (231).

Pacientes com psoríase têm frequência maior de anticorpos contra a gliadina (AGA), presente no glúten. Em 302 pacientes estudados, anticorpo antigliadina foi encontrado em 16%, com IgA aumentado e IgG não aumentado (232). Evidências mostram que dieta livre de glúten pode ser benéfica para aqueles pacientes que têm níveis elevados deste anticorpo, apesar das controvérsias sobre o assunto (233).

O estresse oxidativo e aumento dos radicais livres relacionam-se com a inflamação da pele e os pacientes com psoríase apresentam estado anti-oxidante prejudicado, com baixos níveis de β -caroteno, α -tocoferol e selênio. O selênio apresenta propriedades imunomoduladoras e antiproliferativas e seu baixo nível pode ser decorrente da baixa ingestão ou da excessiva descamação da pele e pode ser fator para desenvolvimento ou agravamento da psoríase (234). O calcitriol exerce efeito antiproliferativo e pró-diferenciativo e deve-se considerar a suplementação oral de vitamina D em certos casos (235).

Eventos estressantes agudos, como exames, acidente, atentados sexuais e morte, entre outros, estão frequentemente associados ao desencadeamento e exacerbação da doença. Aproximadamente 40% dos pacientes referem piora em torno de um mês do evento e indivíduos que vivem em situações de alto estresse costumam ter doença mais grave. Os mecanismos envolvidos são desconhecidos,

mas acredita-se que que envolva o sistema de modulação neuroendócrina das funções imunológicas (11, 236, 237).

O álcool pode exacerbar a doença pré-existente. Seu uso abusivo é uma resposta ao estresse em consequência do quadro cutâneo e causa a redução das medidas terapêuticas, enquanto a abstinência pode contribuir para a remissão (238).

O risco de psoríase para indivíduos submetidos ao estresse aumenta 20 vezes em indivíduos com HLA-Cw*06 comparado com os que não tem este alelo, segundo trabalho com população chinesa. Para fumantes com HLA-Cw*06, o risco aumenta 11 vezes em relação aos não fumantes sem HLA-Cw*06 (239). O consumo de mais de 20 cigarros por dia está associado ao risco duas vezes maior de desenvolver doença grave (240) e a suspensão do hábito de fumar associa-se com a melhora da psoríase pustulosa palmo-plantar (241).

Pode-se explicar a influência dos fatores ambientais no desencadeamento ou agravamento de doenças como psoríase e vitiligo através da epigenética, que é o estudo das diferenças nos fenótipos na ausência de variação no código genético (242). A pele é exposta a uma grande variedade de agentes ambientais e pode ser alvo de várias doenças autoimunes dependendo das influências gênicas e fatores exógenos (243).

O mecanismo epigenético mais comum é a metilação, que ocorre na base de alguns genes e impede sua ligação. Mais de 70% dos genes de um indivíduo podem ser ativados ou desativados desta forma. Por exemplo, a azacitidina, droga capaz de desbloquear um gene silenciado pelo processo de metilação, é útil no tratamento de síndromes mielodisplásicas e leucemia (244). No caso dos cânceres de pele, a metilação anormal dos genes promotores da supressão tumoral está relacionada à sua inativação transcricional. Os agentes carcinogênicos ambientais como radiação UV e arsênico podem agir através de mecanismos epigenéticos (242). Outro exemplo pode ser considerada a ação do calcipotriol, usado no tratamento tópico da psoríase e capaz de inibir a proliferação dos queratinócitos, através da diminuição da expressão de dois genes de fatores

de proliferação: EGR1 (do inglês *early growth response-1* e PLK2 (do inglês *polo-like kinase-2*) (245).

Estes mecanismos são essenciais para o desenvolvimento e funcionamento normal do sistema imune. Entretanto, uma falha na manutenção da homeostase epigenética devido a fatores ambientais pode levar a expressão aberrante de genes e disfunção imunológica (243). Hipometilação é associada a doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, lúpus subagudo e esclerodermia. Isto pode ocorrer devido à reatividade cruzada com DNA hipometilado de bactérias (242).

Modificações químicas nas histonas ou no DNA, que alteram a estrutura da cromatina sem mudar a sequência de nucleotídeos, têm efeito na expressão dos genes. Se a cromatina está condensada, os fatores de transcrição não têm acesso ao DNA e os genes permanecem inativos, ao contrário do estado de relaxamento, em que os genes podem ser ativados na medida da necessidade (136).

Outro fenômeno epigenético ocorre através de formas ativas de RNA localizadas nos cromossomos, fora da sequência de DNA, que estão envolvidas em espécie de controle gênico (136). Os microRNAs (miRNAs) e *short interfering* RNAs (siRNAs) são classes de pequenas moléculas regulatórias de 18 a 24 nucleotídeos que funcionam alterando a estabilidade ou eficiência do RNA mensageiro, com quem compartilham sequências semelhantes. Afetam aproximadamente um terço de todos os genes humanos envolvidos em vários tipos de cânceres, desordens neurológicas, hipertrofia cardíaca e doenças da pele como psoríase (246).

5.8 - Interface entre fatores determinantes genéticos e desencadeantes ambientais

Interações entre genes e ambiente são primordiais para o desenvolvimento da doença. Evitar os fatores ambientais relacionados pode diminuir a chance de despertar a doença ou diminuir a gravidade da manifestação clínica, principalmente em indivíduos de alto risco genético. Mas como identificar quem são os indivíduos com risco genético? Como realizar uma triagem, considerando os custos envolvidos? Seria possível estabelecer programas de prevenção? Estas questões são difíceis de responder e não há dados na literatura que discutam estas possibilidades.

Psoríase é mais prevalente em parentes de primeiro-grau de pacientes com diagnóstico conhecido, sendo que o risco neste grupo pode chegar a 25%.

Em nosso serviço, foi possível fazer o estudo de 13 famílias com mais de uma geração afetada pela psoríase. O objetivo deste estudo foi demonstrar o perfil destas famílias e o que é possível fazer para melhorar sua qualidade de vida. Foi realizada triagem genética de todos os parentes de primeiro-grau dos pacientes, afetados ou não, totalizando 59 indivíduos. Destes, 34 (56.6%) já apresentavam psoríase no início do seguimento, com média de idade de início da doença de 29,9 anos, sendo 18 mulheres e 16 homens. A forma clínica mais observada nestes indivíduos foi psoríase vulgar em 91,2%. A doença dos familiares foi considerada leve em 71% dos casos. Dos 59, 17 (28,8%) indivíduos com psoríase apresentavam HLA-Cw*06. Seis (10,2%) indivíduos com HLA-Cw*06 não apresentaram sinais da doença. Durante o período de observação, não se observaram novos casos da doença no grupo estudado³.

Um programa ideal para o acompanhamento de pacientes e familiares deve ser baseado na educação sobre a doença, através de orientação médica, de enfermagem, palestras e distribuição de material informativo. Especialmente em crianças e adolescentes, a detecção e o tratamento precoce de infecções é importante para evitar as reações cruzadas. Evitar medicamentos conhecidamente

³ Trabalho desenvolvido no Ambulatório de Psoríase da Disciplina de Dermatologia e no Laboratório de Imunogenética de Transplantes do Hospital das Clínicas, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP; enviado para publicação.

relacionados ao agravamento da doença constitui uma medida válida (247). O seguimento clínico para controle do peso, pressão arterial e dislipidemia ajuda na prevenção de comorbidades associadas à psoríase, portanto orientação nutricional e atividade física devem ser estimuladas, bem como medidas agressivas contra tabagismo e etilismo. A preocupação com as comorbidades é crescente e já há um consenso sobre as recomendações para seguimento destes pacientes (248).

Oitenta e um pacientes participam, atualmente, de um outro trabalho sobre qualidade de vida em nosso serviço, sendo a idade média de 53,1 anos ($\pm 14,9$). Quanto aos hábitos, 16,1% são fumantes e 18,5% são etilistas. Considerando as comorbidades, 11,1% são obesos, 17,3% diabéticos, 19,8% dislipidêmicos, 44,4% hipertensos, 9,9% nefropatas e 11,1% hepatopatas. Apresentam transtornos psiquiátricos 17 pacientes (21,0%).⁴

O acompanhamento psicoterápico é indicado a todos os pacientes, principalmente para aqueles com alterações comportamentais, situação familiar complicada, problemas de trabalho e dificuldades de relacionamento. Características psicológicas e de personalidade dos pacientes e familiares devem ser consideradas, pois comportamento impulsivo, pessimismo, tristeza, abuso de álcool e depressão são atributos frequentemente encontrados em pacientes psoriáticos (249). O suporte psicológico deve enfatizar a automotivação e a redução do estresse.

Transmitir conhecimento sobre a doença, melhorar os cuidados com a pele e minimizar seu impacto psicológico são os principais objetivos dos programas de seguimento paralelos ao atendimento médico (250). Não há como prevenir a doença, mas é possível aplicar o conhecimento atual sobre os fatores desencadeantes nos indivíduos de maior risco genético. Através destes marcadores, é possível selecionar um grupo de indivíduos de maior risco e promover ações para minimizar os efeitos de fatores desencadeantes ambientais sobre a marcha da psoríase.

⁴ Trabalho em desenvolvimento no Ambulatório de Psoríase da Disciplina de Dermatologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

5.9 - Considerações finais

“Para efeito de diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças, o que se descobriu depois do mapeamento do genoma constitui o começo da verdadeira revolução biológica. Já se sabia que os fatores ambientais, ou seja, experiências, os hábitos e o estilo de vida também influenciam nesses processos. Não se tinha idéia, porém, de como se dava essa influência. São muito mais atuantes na ativação ou desativação dos genes do que se pensava. A nova fronteira da genética é estabelecer de forma mais precisa como o ambiente influencia os genes (251).”

De acordo com a literatura consultada, até o presente momento, este é o primeiro trabalho que avaliou o papel da região promotora do TNF- α em pacientes brasileiros com psoríase.

O conhecimento de fatores de riscos genéticos e ambientais pode permitir melhor abordagem do paciente, ações de prevenção e melhora na qualidade de vida.

A população brasileira, apesar de sua diversidade genética, deve ser estudada para os marcadores genéticos associados a doenças. Estes resultados devem encorajar novas pesquisas sobre o assunto com a intenção de se compreender melhor o perfil imunogenético dos pacientes brasileiros, seus marcadores de risco, resposta ao tratamento e prognóstico.

6 - CONCLUSÕES

I. (A) Foi realizada a tipificação dos alelos HLA classe I e II por meio da metodologia empregada, no grupo de pacientes e no grupo-controle de indivíduos saudáveis.

(B) Os alelos que representaram tendência de associação à psoríase na população estudada foram HLA-B*13, -B*37, -B*39, -DRB1*07 e -DRB1*11; enquanto os alelos HLA-Cw*06 e -Cw*12 podem ser considerados fatores de risco genético com significância estatística. O alelo HLA-Cw*12 foi mais frequente no grupo de pacientes que iniciou a doença nos primeiros anos de vida e não há este registro em outras populações.

II. (A) Foi possível identificar os polimorfismos da região promotora do TNF- α SNPs -238 e -308 por meio dos métodos utilizados. Foram estimados os haplótipos estendidos relacionados aos SNPs do TNF- α -238 e -308 pela análise computacional.

(B) Ao se comparar frequência de alelos, genótipos e haplótipos da região promotora do TNF- α -238 e -308 entre pacientes com psoríase e grupo-controle de indivíduos saudáveis, não se encontrou diferença com significância estatística. Estes dados não correspondem ao descrito para a população caucasiana.

III. (A) O presente estudo sugere que os alelos HLA-B*37, -Cw*06, -Cw*12 e -DRB1*07 estão relacionados a doença mais grave e extensa. O alelo DRB1*04 revelou tendência a associação negativa com a doença, podendo conferir proteção. Ao se comparar o grupo I com o grupo II, apresentou tendência de associação com o grupo de evolução desfavorável o alelo HLA-B*37, que pode ser interpretado como um fator de mau prognóstico.

(B) Este estudo apontou uma alta frequência do genótipo TNF- α -238 G/G, assim como do alelo -238G, no grupo com doença mais grave. O contrário é verdadeiro e pode-se afirmar que o genótipo -238 G/A, assim como o alelo -238A, estão em frequência maior no grupo de doença mais leve. O haplótipo -238A-308G foi encontrado em frequência reduzida no grupo de pior evolução, revelando um efeito protetor.

IV. Foi apresentada discussão sobre os principais fatores ambientais relacionados à doença e a interação com os fatores genéticos estudados. Aplicações práticas para os resultados encontrados foram discutidas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Javitz HS, Ward MM, Farber E, Nail L, Vallow SG. The direct cost of care for psoriasis and psoriatic arthritis in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46(6):850-60.
2. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. Psoriasis: a T-cell mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 1995; 16:145-9.
3. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. *Hum Immunol* 2001; 62:1191-9.
4. Goffe B, Cather JC. Etanercept: An overview. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49(2 Suppl):S105-11.
5. Takahashi MDA. Psoríase. In: Sampaio S, Rivitti . *Dermatologia*. São Paulo: Ed. Artes Médicas Ltda; 1988. p.170-177.
6. Fonseca A, Souza EM. *Dermatologia Clínica*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 1984. p.307-16.
7. Glickman FS. Lepra, psora, psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14(5 Pt 1): 863-6.
8. Griffiths CFN, Camp RDR, Barker JNWN. Psoriasis. In: Burn's, et al. *Rook's textbook of dermatology*. 7^a ed. EUA. Balckwell Science; 2004. p. 35.1-35.69 v.2.
9. Farber EM, Nall ML. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica* 1974; 148(1):1-18.

10. Bell LM, Sedlack R, Beard CM, Perry HO, Michet CJ, Kurland LT. Incidence of psoriasis in Rochester, Minn, 1980-1983. *Arch Dermatol* 1991; 127(8):1184-7.
11. Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol* 2007; 25:535-46.
12. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Documento Eletrônico. [acesso em 10 de fev de 2009]. Disponível em: URL: <http://www.sbd.org.br/medicos>.
13. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13(3): 450-6.
14. Penneys NS, Ziboh V, Simon P, Lord J. Pathogenesis of Woronoff ring in psoriasis. *Arch Dermatol* 1976; 112(7):955-7.
15. Gupta S. Many faces of Koebner phenomenon in psoriasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2002; 68(4):222-4.
16. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Raychaudhuri SK. Revisiting the Koebner phenomenon: role of NGF and its receptor system in the pathogenesis of psoriasis. *Am J Pathol* 2008; 172(4):961-71.
17. Fry L. Psoriasis. *Br J Dermatol* 1988; 119(4):445-61.
18. Christensen TE, Callis KP, Papenfuss J, Hoffman MS, Hansen CB, Wong B, et al. Observations of psoriasis in the absence of therapeutic intervention identifies two unappreciated morphologic variants, thin-plaque and thick-plaque psoriasis, and their associated phenotypes. *J Invest Dermatol* 2006; 126(11):2397-403.

19. Rakkhit T, Panko JM, Christensen TE, Wong B, Nelson T, Papenfuss J, et al. Plaque thickness and morphology in psoriasis vulgaris associated with therapeutic response. *Br J Dermatol* 2009; 160(5):1083-9.
20. Griffiths CEM, Barker JNWN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 370:263-71.
21. Romiti R., Arnone M, Maragno L, Takahashi MDF. Psoríase na infância e adolescência. *An Bras Dermatol* 2009; 84(1):9-22.
22. Marks J. Erythroderma and its management. *Clin Exp Dermatol* 1982; 7(4):415-22.
23. Augey F, Renaudier P, Nicolas JF. Generalized pustular psoriasis (Zumbusch): a French epidemiological survey. *Eur J Dermatol* 2006; 16(6):669-73.
24. Telfer NR, Dawber RP. Generalized pustular psoriasis associated with withdrawal of topical clobetasol-17-propionate. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17(1):144-5.
25. Augey F, Dissard C, Normand I, Daumont M. Generalized pustular psoriasis (von Zumbusch) following iatrogenic hypocortisolism. *Eur J Dermatol* 2004; 14(6):415-7.
26. Saeki H, Watanabe A, Tada Y, Kakinuma T, Komine M, Ihn H, et al. Juvenile pustular psoriasis associated with steroid withdrawal syndrome due to topical corticosteroid. *J Dermatol* 2008; 35(9):601-3.

27. O'Neill T, Silman AJ. Psoriatic arthritis. Historical background and epidemiology. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994; 8(2):245-61.
28. Zachariae H. Prevalence of joint disease in patients with psoriasis: implications for therapy. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4:441-7.
29. Aslanian FMNP, Lisboa FFCP, Iwamoto A, Carneiro SCS. Clinical and epidemiological evaluation of psoriasis: clinical variants and articular manifestations. *JEADV* 2005; 19:134-43.
30. Moll JM, Wright V. The pattern of chest and spinal mobility in ankylosing spondylitis. An objective clinical study of 106 patients. *Rheumatol Rehabil* 1973; 12(3):115-34.
31. Daunt SO, Robertson JC. Spontaneous fusion of atlanto-axial dislocation in psoriatic spondylitis. *Clin Rheumatol* 1985; 4(4):465-9.
32. Könönen M. Craniomandibular disorders in psoriasis. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15(2):108-12.
33. Nicolas JF, Larbre JP, Faure M, Thivolet J. Psoriatic arthritis affecting the sternoclavicular joint. *J Am Acad Dermatol* 1988;18(4 Pt 1):752-4.
34. Lewin K, Dewit S, Ferrington RA. Pathology of the finger nail in psoriasis. A clinicopathological study. *Br J Dermatol* 1972; 86(6):555-63.
35. Zaias N. Psoriasis of the Nail. A Clinical-Pathologic Study. *Arch Dermatol* 1969; 99(5):567-79.

36. Haneke E. Non-infectious inflammatory disorders of the nail apparatus. J Dtsch Dermatol Ges. 2009 Apr 6 [acesso em 6 abr 2009]. Disponível em: URL:
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/122305426/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>.
37. Kouskoukis CE, Scher RK, Lebovits PE. Psoriasis of the nails. Cutis 1983; 31(2):169-74.
38. Woo SM, Choi JW, Yoon HS, Jo SJ, Youn JI. Classification of facial psoriasis based on the distributions of facial lesions. J Am Acad Dermatol 2008; 58(6): 959-63.
39. Van De Kerkhof PC, Murphy GM, Austad J, Ljungberg A, Cambazard F, Duvold LB. Psoriasis of the face and flexures. J Dermatolog Treat 2007; 18(6):351-60.
40. Knight AG. Pityriasis amiantacea: a clinical and histopathological investigation. Clin Exp Dermatol 1977; 2(2):137-43.
41. Abdel-Hamid IA, Agha SA, Moustafa YM, El-Labban AM. Pityriasis amiantacea: a clinical and etiopathologic study of 85 patients. Int J Dermatol 2003; 42(4): 260-4.
42. Shuster S. Psoriatic alopecia. Br J Dermatol 1972; 87(1): 73-7.
43. Gül U, Soylu S, Demiriz M. Noncicatricial alopecia due to plaque-type psoriasis of the scalp. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2009; 75(1):78-80.
44. Sklavounou A, Laskaris G. Oral psoriasis : report of a case and review of the literature. Dermatologica 1990; 180 (3):157-9.

45. Lier GC, Mrowietz U, Wolfart M, Warnke PH, Wiltfang J, Springer IN. Psoriasis of the tongue. *J Craniomaxillofac Surg*. 2009; 37(1):51-3.
46. Hietanen J, Salo OP, Kanerva L, Juvakoski T. Study of the oral mucosa in 200 consecutive patients with psoriasis. *Scand J Dent Res* 1984; 92(1):50-4.
47. Pogrel MA, Cram D. Intraoral findings in patients with psoriasis with a special reference to ectopic geographic tongue (erythema circinata). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 66(2):184-9.
48. Robinson CM, Di Biase AT, Leigh IM, Williams DM, Thornhill MH. Oral psoriasis. *Br J Dermatol* 1996; 134(2):347-9.
49. Gonzaga HF, Torres EA, Alchorne MM, Gerbase-Delima M. Both psoriasis and benign migratory glossitis are associated with HLA-Cw6. *Br J Dermatol* 1996; 135(3):368-70.
50. Buechner SA. Common skin disorders of the penis. *BJU Int* 2002; 90(5):498-506.
51. Catsarou-Catsari A, Katsambas A, Theodoropoulos P, Stratigos J. Ophthalmological manifestations in patients with psoriasis. *Acta Derm Venereol* 1984; 64(6):557-9.
52. Chandran NS, Greaves M, Gao F, Lim L, Cheng BC. Psoriasis and the eye: prevalence of eye disease in Singaporean Asian patients with psoriasis. *J Dermatol* 2007; 34(12):805-10.
53. Yamamoto T, Yokozeki H, Katayama I, Nushioka K. Uveitis in patients with generalized pustular psoriasis. *Br J Dermatol* 1995;132(6): 1023-4.

54. Gladman DD. Axial disease in psoriatic arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9(6):455-60.
55. Gelfand JM, Troxel AB, Lewis JD, Kurd SK, Shin DB, Wang X, et al. The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol* 2007; 143(12):1493-9.
56. Pearce DJ, Nelson AA, Fleischer Jr AB, Balkrishnan R, Feldman SR. The cost-effectiveness and cost of treatment failures associated with systemic psoriasis therapies. *J Dermatol Treat* 2006; 17(1):29-37.
57. Mallbris L, Akre O, Granath F, Yin L, Lindelöf B, Ekbom A, Ståhle-Bäckdahl M. Increased risk for cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients. *Eur J Epidemiol* 2004; 19(3):225-30.
58. Henseler T, Christophers MD. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32:982-6.
59. Margolis D, Bilker W, Hennessy S, Vittorio C, Santanna J, Strom BL. The risk of malignancy associated with psoriasis. *Arch Dermatol* 2001; 137(6):778-83.
60. Gelfand JM, Shin DB, Neimann AL, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. The risk of lymphoma in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 2006; 126(10):2194-201.
61. Poljacki M, Begenesić M, Duran V, Matović L, Matić M, Jovanović M, et al. Psoriasis and autoimmune skin disorders. *Med Pregl* 2002; 55(7-8):325-8.
62. Ryan JG, Dorman AM, O'Connell PG. AA amyloidosis in psoriatic arthritis. *Ir J Med Sci* 2006; 175(2):81-2.

63. Zadrazil J, Tichý T, Horák P, Nikorjaková I, Zíma P, Krejčí K, Strébl P. IgA nephropathy associated with psoriasis vulgaris: a contribution to the entity of 'psoriatic nephropathy'. *J Nephrol* 2006;19(3): 382-6.
64. Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB, Gelfand JM. Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55(5):829-35.
65. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA* 2006; 296(14):1735-41.
66. Toussand S, Kamino H. Psoriasis. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson JR. *Lever's Histopathology of the skin*. 8^a ed. Philadelphia-New York: Ed. Lippincott-Raven; 1997. p. 56-163.
67. Christophers E, Mrowietz V. Psoriasis. In: *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, 5^a ed. Nova York. Ed McGraw Hill; 1999. p. 495-537. v.1.
68. Bowcock AM, Shannon W, Du F, Duncan J, Cao K, Aftergut K, Catier J, Fernandez-Vina MA, Menter A. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet* 2001; 10(17):1793-805.
69. Weinstein GD, McCullough JL, Ross PA. Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1985; 85(6):579-83.
70. Leigh IM, Navsaria H, Purkis PE, McKay IA, Bowden PE, Riddle PN. Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis *in vivo* and *in vitro*. *Br J Dermatol* 1995; 133(4):501-11.

71. Hohl D. Cornified cell envelope. *Dermatologica* 1990; 180(4): 201-11.
72. Elder JT, Fisher GJ, Lindquist PB, Bennett GL, Pittelkow MR, Coffey RJ Jr, et al. Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science* 1989; 243(4892):811-4.
73. Nickoloff BJ, Turka LA, Mitra RS. Direct and indirect control of T-cell activation by keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1995; 105:25-9.
74. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 1994; 180(3):1141-6.
75. Barker JNN. The pathophysiology of psoriasis. *Lancet* 1991; 338:227-30.
76. Cerio N, Griffiths CEM, Cooper KD, Nickolff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* 1989; 121:421-31.
77. Bos JD, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 1999 Jan; 20(1):40-6.
78. Prinz JC, Vollmer S, Boehncke WH, Menssen A, Laisney I, Trommler P. Selection of conserved TCR VDJ rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *Eur J Immunol* 1999; 29(10):3360-8.
79. Drake CG, Kotzin BL. Superantigens: biology, immunology, and potential role in disease. *J Clin Immunol* 1992; 12:149- 62.

80. Swerlick RA, Cunningham MW, Hall NK. Monoclonal antibodies cross-reactive with group A streptococci and normal and psoriatic human skin. *J Invest Dermatol* 1986; 87:367-71.
81. Leung DYM, Walsh P, Giorno R, Norris DA. A potential role for superantigens in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1993; 100:225-8.
82. Chang JCC, Smith LR, 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* 1994; 91: 9282-6.
83. Lewis HM, Baker BS, Bokth S. Restricted T-cell receptor V β gene usage in the skin of patients with gutate and chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 1993; 129:514-20.
84. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Fry L. Psoriasis: a disease of abnormal Keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 1986; 7:256-9.
85. Morganroth GS, Shan LS, Weinstein GD, Voorhees JJ, Cooper KD. Proliferation cells in psoriatic dermis are comprised primarily of T cells, endothelial cells, and factor XIIIa⁺ perivascular dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1991; 96:333-40.
86. Nikaein A, Phillips C, Gilbert SC, Savino D, Silverman A, Stone MJ, et al. Characterization of skin-infiltrating lymphocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 1991; 96(1):3-9.

87. Vissers WH, Amdtz CH, Muys L, Van Erp PE, de Jong EM, van de Kerkhof PC. Memory effector (CD45RO+) and cytotoxic (CD8+) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. *Br J Dermatol* 2004; 150:852-9.
88. Davison SC, Ballsdon A, Allen MH, Barker JN. Early migration of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positive T cells into evolving psoriatic plaques. *Exp Dermatol* 2001;10(4):280-5.
89. Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(3 Suppl 2):S67-80.
90. Griffiths CEM, Dearman RJ, Cumberbatch M, Kimber I. Cytokines and Langerhans cell mobilization in mouse and man. *Cytokine* 2005; 32:67-70.
91. Cumberbatch M, Singh M, Dearman RJ, Young HS, Kimber I, Griffiths CEM. Impaired Langerhans cell migration in psoriasis. *J Exp Med* 2006; 203:953-60.
92. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, Burg G, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 2005; 202(1):135-43.
93. Nestle FO, Gilliet M. Defining upstream elements of psoriasis pathogenesis: an emerging role for interferon-alpha. *J Invest Dermatol.* 2005; 125(5):xiv-xv.
94. Prinz JC. The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17(3):257-70.

95. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009 Mar 26 [acesso em 15 jan 2009]. Disponível em: URL: <http://www.nature.com/jid/journal/vaop/ncurrent/abs/jid200959a.html>
96. Daikeler T, Günaydin I, Einsele H, Kanz L, Kötter I. Transmission of psoriatic arthritis by allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia from an HLA-identical donor. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38(1): 89-90.
97. Kanamori H, Tanaka M, Kawaguchi H, Yamaji S, Fujimaki K, Tomita N, et al. Resolution of psoriasis following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: case report and review of the literature. *Am J Hematol* 2002; 71(1):41-4.
98. He YL, Lu XJ, Qiu JY, Zhu TJ. Severe vulgaris psoriatic patients with acute myelogenous leukaemia and resolution after allogeneic bone marrow transplantation/peripheral blood stem cell transplantation. *Chin Med J* 2005; 118(10):861-5.
99. Masszi T, Farkas A, Remenyi P, Lueff S, Batai A, Krivan G, et al. Ten-year remission of psoriasis after allogeneic but not autologous bone marrow transplantation. *Dermatology* 2006; 212(1):88-9.
100. Elder JT, Nair RP, Vorhees JJ. Epidemiology and genetics of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1994; 102:S24-27.
101. Brandrup F, Holm N, Grunnet N, Henningsen K. Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Dermatol Venereol* 1982; 62(3):229-36.

102. Krueger GG, Duvic M. Epidemiology of psoriasis: clinical issues. *J Inv Dermatol* 1994;102(6):14S-18S.
103. Pontes LFS, Souza E, Porto LCMS. Sistema HLA: o complexo principal de histocompatibilidade humano. In: Porto LCMS, Pontes LFS. Estudos de associação HLA X doenças. Extratos do I Simpósio Brasileiro. Rio de Janeiro (RJ): Ed UERJ; 2007; p.11-56.
104. Russel JT, Schultes ML, Kuban DJ. Histocompatibility antigens associated with psoriasis. *N Engl J Med* 1972; 287:738-9.
105. Capon F, Munro M, Barker J, Trembath R.. Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J Inv Dermatol* 2002; 118:745-51.
106. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL. 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* 1997; 6:813-20.
107. Veal C, Capon F, Allen M, Heath E, Evans J, Jones A, et al. Family-Based Analysis Using a Dense Single-Nucleotide Polymorphism–Based Map Defines Genetic Variation at PSORS1, the Major Psoriasis-Susceptibility Locus. *Am J Hum Genet* 2002; 71(3):554-64.
108. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004; 64:631-49.
109. Bowcock AM. The genetics of psoriasis and autoimmunity. *Ann Rev Genomics Hum Gen* 2005; 6:93-122.

110. Balendran N, Clough RL, Arguello JR, Barber R, Veal C, Jones AB, et al. Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol* 1999; 113:322-8.
111. Elder JT, Nair RP, Guo SW, Henseler T, Christophers E, Voorhees JJ. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 1994; 130:216-24.
112. Barker JNN. Genetic aspects of psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatol* 2001; 26:321-5.
113. Van Els CACM, D'Amaro J, Pool J, Blokland E, Bakker A, Van Elsen PJ, et al. Immunogenetics of human major histocompatibility antigens: their polymorphisms and immunodominance. *Immunogenetics* 1992; 35:161-5.
114. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993; 14: 349-52.
115. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrot RE, Charron D, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 1997; 49:297-321.
116. Parham P, Lomen CE, Lawlor DA, Ways JP, Holmes N, Coppin HL, et al. Nature of polymorphism in HLA-A, -B, -C molecules. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1998; 85:4005-9.
117. Janeway CA, Travers P, Hunt S, Walport M. *Immunology: The immune system in health and disease*. 3^a ed. EUA. Garland Publishing Inc; 1997.

118. Yang S, GE HS, Zhang AP, Wei SC, Gao M, Wang HY, Chen JJ, Li Y, Liang H, He P, Yang J, Zhang J. Haplotype associations of the MHC with psoriasis vulgaris in Chinese Hans. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 399-405.
119. Sodoyer R, Damotte M, Delovitch TL, Trucy J, Jordan BR, Strachan T. Complete nucleotide sequence of a gene encoding a functional human class I histocompatibility antigen (HLA-Cw3). *EMBO J* 1984; 3:879.
120. Strachan T, Sodoyer R, Damotte M, Jordan BR. Complete nucleotide sequence of a functional class I HLA gene HLA-A3: implications for the evolution of HLA genes. *EMBO J* 1984; 3:887-894.
121. Neefjes JJ, Momburg F. Cell biology of antigen presentation. *Cur Opin Immunol* 1993; 5:27-34.
122. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, 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* 1994; 79:761-71.
123. Kuckelkorn U, Frentzel S, Kraft R, Kostka S, Groettrup M, Kloetzel PM. Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur J Immunol*. 1995; 25(9):2605-11.
124. Strominger JL, Cresswell P, Grey H, Humphreys RE, Mann D, McCune J, et al. The immunoglobulin-like structure of human histocompatibility antigens. *Transplant Rev* 1974; 21(0):126-43.

125. Cresswell P, Dawson JR. Dimeric and monomeric forms of HL-A antigens solubilized by detergent. *J Immunol* 1975; 114(1 Pt 2):523-5.
126. Documento digital. [acesso em 6 abr 2009]. Disponível em: URL: <http://www.gastroped.com.br>.
127. Monaco JJ. Major histocompatibility complex-linked transport proteins and antigen processing. *Immunol Res* 1992; 11:125-32.
128. Rudensky AY, Preston-Hulbert P, Al-Ramadi BK, Rothbard J, Janeway CA. Truncation variation of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* 1992; 359:429-31.
129. Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DA et al. Predominantly naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 1992; 358:764-8.
130. Doherty PC, Zinkernagel RM. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* 1975; 1(7922): 1406-9.
131. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5^a ed. Filadélfia, Saunders Company; 2003.
132. Kawaguchi M, Mitsuhashi Y, Kondo S. Overexpression of tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme in psoriasis. *Br J Dermatol* 2005; 152(5):915-9.
133. Höhler T, Grossmann B, Stradmann-Bellinghausen B, Kaluza W, Reuss E, et al. Differential association of polymorphisms in the TNF α region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:213-218.

134. Hashigucci K, Niizeki H, Naruse T, Ota M, Inamoto N, Nishikawa T, et al. A clinical feature associated with polymorphisms of the TNF region in Japanese patients with palmoplantar pustulosis. *Hum Immunol* 2003; 64:530-7.
135. Biral AC, Magalhães RF, Wastowski IJ, Simoes R, Donadi EA, Simoes AL, et al. Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients. *Eur J Dermatol* 2006; 16(5):523-9.
136. Farah SB. *DNA Segredos e Mistérios*. 2^a ed., São Paulo: Sarvier; 2007, p.114-20.
137. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34:391-9.
138. Juszczynski P, Kalinka E, Bienvenu J, Woszczek G, Borowiec M, Robak T, et al. Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. *Blood* 2002; 100(8):3037-40.
139. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):129-34.
140. Hounie AG, Cappi C, Cordeiro Q, Sampaio AS, Moraes I, Rosário MC, et al. TNF-alpha polymorphisms are associated with obsessive compulsive disorder. *Neurosci Lett* 2008; 442:86-90.

141. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Cardoso MR, Braga PE, Faé KC, et al. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect* 2006; 8:598-603.
142. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 2002; 186: 1687-91.
143. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* 2001; 2:196-204.
144. Roxo VM, Pereira NF, Pavoni DP, Lin MT, Hansen JA, Poersch CO, et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus-are there any associations? *Tissue Antigens* 2003; 62:394-400.
145. de Freitas NM, Imbronito AV, Neves AC, Nunes FD, Pustiglioni FE, Lotufo RF. Analysis of IL-1A(-889) and TNFA(-308) gene polymorphism in Brazilian patients with generalized aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw* 2007; 18: 142-7.
146. Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29:233-9.
147. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, Di Giovine FS, Duff GW. Effects of a TNF- alpha promoter base transition on transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3195-9.

148. D'alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39(2): 150-4.
149. Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, Sevin A, Nedospasov SA, Cambon-Thomsen A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended haplotypes. *Proc Nat Sci* 1991; 88:9717-21.
150. Nedospasov SA, Udalova IA, Kuprash DV, Turetskaya RL. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. Numerous TNF/limphotoxin alleles tagged by two closely linked microsattelites in the upstream region of the limphotoxin (TNF-beta) gene. *J Immunol* 1991; 147:1053-9.
151. Reich K, Garbe C, Blaschke V, Maurer C, Middel P, Westphal G, et al. Response of psoriasis to interleukin-10 is associated with suppression of cutaneous type 1 inflammation, downregulation of the epidermal interleukin-8/CXCR2 pathway and normalization of keratinocyte maturation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(2):319-29.
152. Arias AI, Giles B, Eiermann TH, Sterry W, Pandey JP. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in psoriasis. *Exp Clin Immunogenet* 1997; 14(2):118-22.
153. Höhler T, Kruger A, Schneider PM, Schopf RE, Knop J, Rittner C, et al. A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol* 1997; 109(4):562-5.
154. Rahman P, Siannis F, Butt C, Farewell V, Peddle L, Pellett F, et al. TNF alpha polymorphisms and risk of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:919-23.

155. Nishibu A, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. Lack of association of TNF-238A and -308A in Japanese patients with psoriasis vulgaris, psoriatic arthritis and generalized pustular psoriasis. *J Dermatol Sci* 2002; 29(3):181-4.
156. Tsunemi Y, Nishibu A, Saeki H, Oyama N, Nakamura K, Kishimoto M, et al. Lack of association between the promoter polymorphisms at positions -308 and -238 of the tumor necrosis factor alpha gene and psoriasis vulgaris in Japanese patients. *Dermatol* 2003; 207(4):371-4.
157. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978; 157(4): 238-44.
158. Arruda LH, Moraes AP. The impact of psoriasis on quality of life. *Br J Dermatol* 2001; 144 Suppl 58:33-6.
159. Magalhaes RF, Biral AC, Kraemer MH. Psoriasis in childhood with total remission x chronic disease: clinical application of HLA class I markers. *J Dermatol Sci* 2007; 46(1):77-8.
160. Magalhães RF, Velho PE, De Moraes AM, Cintra ML, Biral AC, Kraemer MH, et al. Linear psoriasis in Brazilian children and HLA haplotypes. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21(10):1439-40.
161. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA for Human Nucleated Cells. *Nuclei Acids Res* 1988; 16:1215.
162. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2h: an alternative to serological

- DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1997; 39:225-35.
163. Vierstraete A. PCR animation. 1999. [acesso em 10 abr 2009]. Disponível em: users.ugent.be/%7Eavierstr/principles/pcr.html.
164. Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17: 915-919.
165. Van Belle G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley TS. *Biostatistics: A Methodology For the Health Sciences*. 2^a ed., EUA, Ed. Wiley; 2004.
166. Dyer P, Warrens A. Design and interpretation of studies of the major histocompatibility complex in disease. In: Lechler R. *HLA and Disease*. San Diego. Academic Press; 1994. p.93-121.
167. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: detecting the strongest associations. *Tissue Antigens* 1994; 43:18-27.
168. Lechler R, Warrens A. HLA and dermatological disease. In: Lechler R & Warrens A (ed.) *HLA in Health and Disease*. London, Academic Press; 2000. p.365-86.
169. Hennekens C, Buring JE. Need for large sample sizes in randomized trials. *Pediatrics* 1987; 79(4):569-71.
170. Rousset F, Raymond M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 1995; 140(4):1413-9.

171. Excoffier L, Laval G, Balding D. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Hum Genomics* 2003; 1: 7-19.
172. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0. An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Onlin* 2005; 1:47-50.
173. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68:978-89.
174. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(1):177-82.
175. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006; 62(4):190-5.
176. Marrero AR, Leite FPN, Carvalho BA, Peres LM, Kommers TC, Cruz IM, et al. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as white in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* 2005; 17:496-506.
177. Yip SY. The prevalence of psoriasis in the Mongoloid race. *J Am Acad Dermatol* 1984; 10(6): 965-8.
178. Gupta MA, Gupta AK. Age and gender differences in the impact of psoriasis on quality of life. *Int J Dermatol* 1995; 34:700-3.
179. Sonkar GK, Usha, Singh S. Is HLA-B27 a useful test in the diagnosis of juvenile spondyloarthropathies? *Singapore Med J* 2008; 49:795-9.

180. Braakenburg AM, De Valk HW, De Boer J, Rothova A. Human leukocyte antigen-B27 associated uveitis: long-term follow-up and gender differences. *Am J Ophthalmol* 2008; 145:472-9.
181. Bonfiglioli R, Conde RA, Sampaio-Barros PD, Louzada-Junior P, Donadi EA, Bertolo MB. Frequency of HLA-B27 alleles in Brazilian patients with psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27:709-12.
182. Atherton DJ, Kahana M, Russell-Jones R. Naevoid psoriasis. *Br J Dermatol* 1989; 120(6):837-41.
183. Al-Fouzan AS, Hassab E, I-Naby HM, Nanda A. Congenital linear psoriasis: a case report. *Pediatr Dermatol* 1990; 7:303-6.
184. Menni S, Restano L, Gianotti R, Boccardi D. Inflammatory linear verrucous epidermal nevus (ILVEN) and psoriasis in a child? *Int J Dermatol* 2000; 39(1):30-2.
185. Lee SH, Rogers M. Inflammatory linear verrucous epidermal naevi: a review of 23 cases. *Australas J Dermatol* 2001; 42:252-6.
186. Happle R. Dohi memorial lecture: New aspects of cutaneous mosaicism. *J Dermatol* 2002; 29:681-92.
187. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M. Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol* 1980; 102:179-184.
188. 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* 1978; 262(3): 337-9.

189. Jee SH, Tsai TF, Tsai WL, Liaw SH, Chang CH, Hu CY. HLA-DRB1*0701 and DRB1*1401 are associated with genetic susceptibility to psoriasis vulgaris in Taiwanese population. *Br J Dermatol* 1998; 139:978-83.
190. Cardoso CB, Uthida-Tanaka AM, Magalhães RF, Magna LA, Kraemer MH. Association between psoriasis vulgaris and MHC-DRB, -DQB genes as a contribution to disease diagnosis. *Eur J Dermatol* 2005; 15(3):159-63.
191. Mallon E, Bunce M, Savoie H, Rowe A, Newson R, Gotch F, Bunker CB. HLA-C and guttate psoriasis. *Br J Dermatol* 2000; 143(6):1177-82.
192. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Love TJ, Valdimarsson H. Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8(+) T cells. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(1):83-93.
193. Queiro R, Sarasqueta C, Belzunegui J, Gonzalez C, Figueroa M, Torre-Alonso JC. Psoriatic spondyloarthropathy: a comparative study between HLA-B27 positive and HLA-B27 negative disease. *Semin Arthritis Rheum* 2002; 31(6):413-8.
194. Karason A, Gudjonsson JE, Upmanyu R, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Runasdottir EH, et al. A susceptibility gene for psoriatic arthritis maps to chromosome 16q: evidence for imprinting. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(1):125-31.
195. Espinoza LR, Jara LJ, Espinoza CG, Silveira LH, Martinez-Osuna P, Seleznick M. There is an association between human immunodeficiency virus infection and spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18(1): 257-66.

196. Taglione E, Vatteroni ML, Martini P, Galluzzo E, Lombardini F, Delle Sedie A, Bendinelli M, Pasero G, Bencivelli W, Riente L. Hepatitis C virus infection: prevalence in psoriasis and psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26(2):370-2.
197. Lapadula G, Iannone F, Covelli M, Numo R, Pipitone V. Anti-enterobacteria antibodies in psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10(5):461-6.
198. Karvonen J, Tilikainen A, Lassus A. HLA antigens in psoriasis. A family study. *Ann Clin Res* 1976; 8(5):298-304.
199. Reich K, Hüffmeier U, König IR, Lascorz J, Lohmann J, Wendler J, Traupe H, Mössner R, Reis A, Burkhardt H. TNF polymorphisms in psoriasis: association of psoriatic arthritis with the promoter polymorphism TNF*-857 independent of the PSORS1 risk allele. *Arthritis Rheum* 2007;56(6):2056-64.
200. Nair RP, Stuart P, Henseler T, Jenisch S, Chia NV, Westphal E, et al. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1833-44.
201. Choonhakarn C, Romphruk A, Puapairoj C, Jirarattanapochai K, Romphruk A, Leelayuwat C. Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais. *Int J Dermatol* 2002; 41(6):330-4.
202. Cassia FF, Carneiro SC, Marques MTQ, Pontes LF, Filgueira AL, Porto LCS. Psoriasis vulgaris and human leucocyte antigens. *JEADV* 2007; 21: 303-10.

203. Kraemer MHS, Uthida-Tanaka AM, Oliveira VC, Biral AC, Cardoso CB, Magalhães RF, et al. Early-onset of psoriasis in Brazilian patients: support for HLA-class I and II analysis. In: Sirisinha S, Chaiyaroj SC, Tapchaisri P. 2^o Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania. Bangkok, Thailand, Monduzzi Editore; 2000. p.69-73.
204. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 170-3.
205. Nedoszytko B, Szczerkowska-Dobosz A, Zabłotna M, Gleń J, Rebała K, Roszkiewicz J. Associations of promoter region polymorphisms in the tumour necrosis factor-alpha gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern Polish population. *Br J Dermatol* 2007; 157: 165-7.
206. Baran W, Szepietowski JC, Mazur G, Baran E. A - 308 promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene does not associate with the susceptibility to psoriasis vulgaris. No difference either between psoriasis type I and type II patients. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2006; 15(3):113-8.
207. Li C, Wang G, Gao Y, Liu L, Gao T. TNF-alpha gene promoter -238G>A and -308G>A polymorphisms alter risk of psoriasis vulgaris: a metanalysis. *J Invest Dermatol* 2007; 127:1886-92.
208. Mössner R, Kingo K, Kleensang A, Krüger U, König IR, Silm H, et al. Association of TNF -238 and -308 promoter polymorphisms with psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis but not with pustulosis palmoplantar. *J Invest Dermatol* 2005; 124(1):282-4.

209. Lee HJ, Sinha AA. Cutaneous lupus erythematosus: understanding of clinical features, genetic basis, and pathobiology of disease guides therapeutic strategies. *Autoimmunity* 2006; 39(6):433-44.
210. Biral AC, Magalhaes RF, Wastowski IJ, Simoes R, Donadi EA, Simoes AL, et al. Extensive genetic polymorphism in the haplotype STR-TNF and HLA class I with the onset and evolution of psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 2009, *in press*.
211. de Vlam K, Gotlieb AB, Fitzgerald O. Biological biomarkers in psoriatic disease. A review. *J Rheumatol* 2008; 35:1443-8.
212. Seitz M, Wirthmüller U, Möller B, Villiger PM. The -308 tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNF alpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology* 2007; 46(1):93-6.
213. Mugnier B, Balandraud N, Darque A, Roudier C, Roudier J, Revirion D. Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(7):1849-52.
214. Guis S, Balandraud N, Bouvenot J, Auger I, Toussiroit E, Wendling D, et al. Influence of -308 A/G polymorphism in the tumor necrosis factor alpha gene on etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 57(8):1426-30.
215. Cuchacovich M, Soto L, Edwardes M, Gutierrez M, Llanos C, Pacheco D, et al. Tumour necrosis factor (TNF)alpha -308 G/G promoter polymorphism and TNFalpha levels correlate with a better response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2006; 35(6):435-40.

216. Telfer NR, Chalmers RJ, Whale K, Colman G. The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch Dermatol* 1992; 128:39-42.
217. Gudjonsson JE, Thorarinsson AM, Sigurgeirsson B, Kristinsson KG, Valdimarsson H. Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol* 2003; 149(3):530-4.
218. Obuch ML, Maurer TA, Becker B, Berger TG. Psoriasis and human immunodeficiency virus infection. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27(5 Pt 1):667-73.
219. de Socio GVL, Simonetti S, Stagni G. Clinical improvement of psoriasis in an AIDS patient effectively treated with combination antiretroviral therapy. *Scand J Infect Dis* 2006; 38(1):74-5.
220. Abel EA, Diccico LM, Oremberg EK. Drugs in exacerbation of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 1986; 15:1007-22.
221. Brauchli YB, Jick SS, Curtin F, Meier CR. Association between beta-blockers, other antihypertensive drugs and psoriasis: population-based case-control study. *Br J Dermatol* 2008; 158(6):1299-307.
222. Poikolainen K, Reunala T, Karvonen J . Smoking, alcohol and life events related to psoriasis among women. *Br J Dermatol* 2006; 130(4):473-7.
223. Ros A-M, Eklund G. Photosensitive psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17:752-8.
224. Higa-Sansone G, Szomstein S, Soto F, Brasecsco O, Cohen C, Rosenthal RJ. Psoriasis remission after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg* 2004; 14(8):1132-4.

225. de Menezes Ettinger JE, Azaro E, de Souza CA, dos Santos Filho PV, Mello CA, Neves M Jr, de Amaral PC, Fahel E. Remission of psoriasis after open gastric bypass. *Obes Surg* 2006; 16(1):94-7.
226. Araújo MLD, Burgos MGPA, Moura ISC. Influências nutricionais na psoríase. *Na Brás Dermatol* 2009;84(1):90-2.
227. Ruceviae I, Perl A, Barisiae-Drusko V, Adam-perl M. The role of low energy diet in psoriasis vulgaris treatment. *Coll Antropol.* 2003; (Supl.1):41-8.
228. Hamminga EA, van der Lely AJ, Neumann HA, Thio HB. Chronic inflammation in psoriasis and obesity: implications for therapy. *Med Hypothesis* 2006; 67:768-73.
229. Wolters M. Diet and psoriasis: experimentalclinical and evidence. *Br J Dermatol.* 2005; 153:706-14.
230. Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, Dugas M, Mailhammer R, Van Eden W, et al. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med* 2003; 9(1):40-6.
231. Mayser P, Grinn H, Gringer F. Omega-3 fatty acids in psoriasis. *Br J Nutrition* 2002; 87 (Suppl 1):S77-82.
232. Michaelsson G, Gerden B, Ottosson M. Patients with psoriasis often have increased serum levels of IgA antibodies to gliadin. *Br J Dermatol* 1993; 129:667-73

233. Woo WK, McMillan SA, Watson RG, McCluggage WG, Sloan JN, McMillan JC. Coeliac disease – associated antibodies correlate with psoriasis activity. *Br J Dermatol* 2004; 151:891-4.
234. Serwin AB, Wasowicz W, Gromadzinska J, Chodyncka B. Selenium status in psoriasis and its relations to the duration and severity of the disease. *Nutrition* 2003; 19(4): 301-4.
235. Holick MF, Chimeh FN, Ray S. Topical PTH (1-34) is a novel, safe and effective treatment for psoriasis: a randomized self-controlled trial and an open trial. *Br J Dermatol* 2003;149(2):370-6.
236. Fortune DG, Richards HL, Main CJ, Griffiths CEM. What patients with psoriasis believe about their condition. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 196-201.
237. Fortune DG, Richards HL, Griffiths CE. Psychologic factors in psoriasis: consequences, mechanisms and interventions. *Dermatol Clin* 2005; 23(4):681-94.
238. Gupta MA, Schork NJ, Gupta AK, Ellis CN. Alcohol intake and treatment responsiveness of psoriasis: a prospective study. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28:730-2.
239. Jin Y, Yang S, Zhang F, Kong Y, Xiao F, Hou Y, et al. Combined effects of HLA-Cw6 and cigarette smoking in psoriasis vulgaris: a hospital-based case-control study in China. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23(2):132-7.
240. Fortes C, Mastroeni S, Leffondre K, et al. Relationship between smoking and the clinical severity of psoriasis. *Arch Dermatol* 2005; 141:1580-4.

241. Michaelsson G, Gustafsson K, Hagforsen E. The psoriasis variant palmoplantar pustulosis can be improved after cessation of smoking. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:737-8.
242. Millington GW. Epigenetics and dermatological disease. *Pharmacogenomics* 2008; 9(12):1835-50.
243. Strickland FM, Richardson BC. Epigenetics in human autoimmunity. Epigenetics in autoimmunity - DNA methylation in systemic lupus erythematosus and beyond. *Autoimmunity* 2008; 41(4): 278-86.
244. Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, et al. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2009 fev 5 [acesso em 10 de fev de 2009]. Disponível em: URL:
<http://www.nature.com/leu/journal/vaop/ncurrent/abs/leu2008397a.html>
245. Kristl J, Slanc P, Krasna M, Berlec A, Jeras M, Strukelj B. Calcipotriol affects keratinocyte proliferation by decreasing expression of early growth response-1 and polo-like kinase-2. *Pharm Res* 2008; 25(3):521-9.
246. Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59(5): 725-37.
247. Nancy AL, Yehuda S. Prediction and prevention of autoimmune skin disorders. *Arch Dermatol Res* 2009; 301(1):57-64.
248. Kimball AB, Gladman D, Gelfand JM, Gordon K, Horn EJ, Korman NJ, et al. National Psoriasis Foundation clinical consensus on psoriasis comorbidities

and recommendations for screening. J Am Acad Dermatol 2008;
58(6):1031-9.

- 249. Bahmer JA, Kuhl J, Bahmer FA. How do personality systems interact in patients with psoriasis, atopic dermatitis and urticaria? Acta Derm Venereol, 2007; 87(4): 317-24
- 250. Skarpathiotakis M, Fairlie C, Ryan S. Specialized education for patients with psoriasis: a patient survey on its value and effectiveness. Dermatol Nurs 2006; 18(4):358-61.
- 251. Segatto C. Decifrei meu DNA. Revista Época. Ed. Globo. p.68-76, 20 abril 2009.

8 – ANEXOS

ANEXO 1

TABELA: SISTEMA DE AVALIAÇÃO PASI

Pontos	0	1	2	3	4	5	6
Eritema							
Infiltração							
Descamação							
% Área	0	<10	10<30	30<50	50<70	70<90	90 -100

Cabeça (C)

Escore

Eritema
 Infiltração
 Descamação

 Soma
 x Área

 =
 x 0,1 =

Tronco (T)

Escore

Eritema
 Infiltração
 Descamação

 Soma
 x Área

 =
 x 0,3 =

Membros Superiores (MS)

Escore

Eritema
 Infiltração
 Descamação

 Soma
 x Área

 =
 x 0,2 =

Membros Inferiores (MI)

Escore

Eritema
 Infiltração
 Descamação

 Soma
 x Área

 =
 x 0,4 =

PASI = (C) + (T) + (MS) + (MI) =

Fonte: Sandimmun, Psoríasis. A clinical and pharmacological review. Sandoz Pharma Ltd. Basle Switzerland, 1991

ANEXO 2

Tabela 22: Populações estudadas para HLA classe I e II e relação com psoríase (p<0.05).

Autores	País	Ano	N	C	HLA - I	HLA - II	Haplótipo estendido
Ikäheimo et al.	Finlândia	1996	70	200	Cw6	DR7	A2 B13 Cw6 DR7 DQA1*0201
Gonzaga et al.	Brasil	1996	22	142	Cw6	–	–
					B17		
					B13		
Enerback et al.	Suécia	1997	201	77	CW* 06	–	–
Shiou-Hwa et al.	Taiwan	1998	76	238	–	DRB1*0701	DRB1*0701 DQA1*0201 DQB1*0201
Tai-Gyu et al.	Coréia	2000	84	98	A1)	DRB1*07	A30B13Cw*0602DRB1*07DQA1*02 DQB1*02DPB1*1701
					A30	DRB1*10	
					B13	DQA1*02	A1B37Cw*0602DRB1*10DQA1*01DQB1*05
					B37	DPB1*1701	
					Cw*0602	DQB1*02	
Kundakçi et al.	Turquia	2002	100	201	A30	DR7	
					Cw3	DR14	
					Cw6	DQ8	
Luszczek et al.	Polônia	2002	102	123	Cw6*	–	–
Xue-Jun et al.	China	2003	166	204	A*26	–	–
					B*13		
					B*27		
					Cw*0602		
Xue-Jun et al.	China	2004	189	273	–	DQA1*0201	–
						DQA1*0104	
Szczerkowska et al.	Polônia	2004	78	70	Cw6*	–	–
Cardoso et al.	Brasil	2005	60	100	–	DRB3*02	DRB1*0102 DQB1*05
						DRB1*0102	DRB1*0701 DQB1*03
Yang et al.	China	2004	138	149	A*26	DQA1*0104	A*26 B*27 Cw*0602
					B*27	DQA1*0201	DRB1*0701 DQA1*0201 DQB1*0701/02
					B*57	DQB1*0303	A*26 DRB1*0701/02 DQA1*0201 DQB1*0303
					Cw*0602	DRB1*0701	

N: número de pacientes; C: número de controles (Adaptado de Cássia et al., 2007).

Tabela 23: Populações estudadas para HLA classe I e II e relação com psoríase tipo I ($p < 0.05$).

Autores	País	Ano	N	C	HLA - I	HLA - II	Haplótipo estendido
Schmitt-Egenolf et al.	Alemanha	1993	47		–	DRB1*0701/02 DQA1*0201 DQB1*0303	DRB1*0701/02 DQA1*0201 DQB1*0303
Schmitt-Egenolf et al.	Alemanha	1996	90	147	Cw6 B57	DQB1*0303	Cw6B57 DRB1*0701/02 DQA1*0201 DQB1*0303
Shiou-Hwa et al.	Taiwan	1998	53	238	–	DRB1*1401	DRB1*1401 DQA1*0101 DQB1*0503
Vejbaesya et al.	Tailândia	1998	67	140	A*0207 B46 B57	DQB1*0303	A1B57DRB1*0701DQA1*0201DQB1*0303 A2B46DRB1*0901DQA1*0301DQB1*0303
Tai-Gyu et al.	Coréia	2000	62	98	B37 (42.8) Cw*0602 (58.5) Cw*0602 (14.45)	DPB1*1701	A30B13Cw*0602DRB1*07DQA1*02DQB1*02
Kastelan et al.	Croácia	2000	44	139		DR7	–
Kastelan et al.	Croácia	2003	50	140	–	DRB1*0701 DQA1*0201 DQB1*0201 DQB1*0303	Cw*0602 B57 DRB1*0701 DQA1*0201 DQB1*0201
Choonhakarn et al.	Tailândia	2002	95	300	A*01 A*0207 A*30 B*08 B*13 B*4601 B*57 Cw*01 Cw*0602	DRB1*0701	A*30 B*13 Cw*0602 DRB1*07 DQB1*02 A*0207 B*4601 Cw*01 DRB1*09 DQB1*0303 A*01 B*57 Cw*0602 DRB1*07 DQB1*0303
Kundakçi et al.	Turquia	2002	68	201	A30 B50 Cw6	DR7	
Xue-Jun et al.	China	2003	123	204	Cw*0602	–	–
Yang et al.	China	2004	113	149	–	–	A*26-B*27 DQA1*0201-DQB1*0303 DRB1*0701/02-DQA1*0104 DRB1*0701/02-DQB1*0303 A*26-DRB1*0701/02-DQA1*0201-DQB1*0303

N: número de pacientes; C: número de controles (Adaptado de Cássia et al., 2007).

Tabela 24: Populações estudadas para HLA classe I e II e relação com psoríase tipo II ($p<0.05$).

Autores	País	Ano	N	C	HLA - I	HLA - II	Haplótipo estendido
Shiou-Hwa et al.	Taiwan	1998	23	238	–	DRB1*0701	-
Choonhakarn et al.	Tailândia	2002	45	300	A*0207 A*30 Cw*01	DRB1*1401	-
Kundakçi et al.	Turquia	2002	32	201	Cw7		-

N: número de pacientes; C: número de controles (Adaptado de Cássia et al., 2007).

Tabela 25: Populações estudadas para HLA classe I e II e alelos protetivos contra psoríase ($p<0.05$).

Autores	País	Ano	N	C	HLA - I	HLA - II	Haplótipo estendido
Cardoso et al.	Brasil	2005	60	100	–	DRB1*04 DRB1*1302	DRB1*0405-DQB1*03
Tai-Gyu et al.	Coréia	2000	84	98	–	–	A33-B44-Cw*1401-DRB1*13-DQA1*01-DQB1*06
Xue-Jun et al.	China	2004	189	273	–	DQA1*0501	–
Vejbaesya et al.	Tailândia	1998	67	140	–	DQB1*0301	
Shiou-Hwa et al.	Taiwan	1998	76	238	–	DQA1*0501	DRB1*1101-DQA1*0501-DQB1*0301
Kundakçi et al.	Turquia	2002	68	201	A66 Cw2 Cw4	DR11	
Choonhakarn et al.	Tailândia	2002	95	300	A*24 A*33 Cw*04		
Luszczek et al.	Polônia	2002	102	123	Cw*07		

N: número de pacientes; C: número de controles (Adaptado de Cássia et al., 2007).

9 – APÊNDICES

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Informativo

**Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP**

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMATIVO PARA O PACIENTE DERMATOLÓGICO

PROJETO: ESTUDO IMUNOGENÉTICO EM PSORÍASE

RESPONSÁVEL: Dra. RENATA FERREIRA MAGALHÃES, ALUNA DE PÓS-GRADUAÇÃO

ORIENTADORA: Dra. ANA MARIA UTHIDA TANAKA

CO-ORIENTADORA: Dra MARIA HELENA S. KRAEMER

NOME DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL:

IDADE:

ENDEREÇO:

RG:

Autorizo a médica *Renata Ferreira Magalhães*, da Disciplina de Dermatologia, Departamento de Clínica Médica, FCM UNICAMP, a realizar os seguintes procedimentos: *avaliação clínica e laboratorial, através de exame físico e coleta de sangue para determinação dos Antígenos de Histocompatibilidade (HLA).*

Estes procedimentos se justificam para fins de pesquisa, sendo que se buscam marcadores laboratoriais que ajudem no diagnóstico e prognóstico de pacientes com psoríase.

Entendo não ser obrigado a submeter-me aos procedimentos, sendo de minha responsabilidade problemas que afetem a minha saúde, advindos de tal atitude.

Autorizo, ainda, a documentação científica iconográfica (fotografias, slides e similares) com finalidade didática e publicação científica, desde que a minha identidade e privacidade sejam preservadas.

Há garantia da parte do médico responsável de esclarecimentos sobre quaisquer dúvidas que o paciente apresentar, como a não obrigatoriedade de continuar na pesquisa, caso seja da minha vontade.

Para contacto com o médico responsável:

Telefone: (19) 37887776, Ambulatório de Dermatologia

Para contacto com o Comitê de Ética em Pesquisa:

Telefone: (19) 37888936

Campinas,

Assinatura do paciente ou responsável:

Assinatura do médico responsável:



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP

☎ (0__19) 3788-8936

fax (0__19) 3788-8925

📧 cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 16/07/02
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 299/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO IMUNOGENÉTICO EM PACIENTES COM PSORÍASE DE INÍCIO PRECOCE”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Ferreira Magalhães

INSTITUIÇÃO: Departamento de Clínica Médica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 20/06/2002

II - OBJETIVOS

Identificar o eventual papel marcador do fenótipo HLA na psoríase com início precoce (até os 18 anos de idade).

III - SUMÁRIO

Estudo prospectivo em pacientes que, no período de janeiro de 2000 a janeiro de 2002, tenham sido atendidas no Ambulatório de Dermatologia do HC da UNICAMP e tenham atendido aos critérios de inclusão. Após coleta de amostra de sangue, tais pacientes serão fenotipados, sendo os resultados obtidos comparados com painel de grupo controle já disponível na instituição.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Estudo adequadamente planejado, indicando a consecução do objetivo proposto. O resultado tem inegável importância clínica, considerando o aspecto nebuloso da etiologia da psoríase.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente

caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

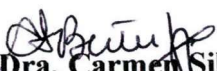
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também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

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

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de julho de 2002.


Prof.ª Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 22/05/07.
(PARECER CEP: N° 299/2002)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO IMUNOGENÉTICO COM PSORÍASE DE INÍCIO PRECOCE”

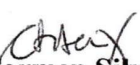
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Ferreira Magalhães

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a mudança de orientação do estudo para a Profa. Maria Helena Stangler Kraemer, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de maio de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

APÊNDICE 2

Tabela 6: Características clínicas e evolução do grupo de pacientes com psoríase.

N	P	Início (anos)	Sexo	AF	FD	FC	U	C	M	ANTI- TNF	Grupo
1	ACP	03	F	+	+	V	-	+	-	-	I
2	CASP	31	F	+	-	V	+	+	-	-	II
3	ACC	13	F	-	+	V	+	+	+	-	I
4	MFB	01	F	-	-	V	-	+	-	-	I
5	LBP	11	M	-	+	V	+	+	-	-	II
6	RT	16	M	+	+	V	+	+	+	-	II
7	AAS	10	F	+	+	G	-	+	-	-	I
8	EML	04	M	-	+	V/AP	+	+	-	+	II
9	JAC	03	F	-	+	V	+	+	+	-	I
10	EML	06	M	-	-	V	-	-	-	-	I
11	CLMLM	13	F	+	+	V	+	+	-	-	I
12	ICC	01	F	-	+	V	+	-	-	-	I
13	DSS	06	F	-	+	V	-	+	-	-	I
14	TC	13	F	+	+	G	+	+	-	+	II
15	AFM	12	F	-	-	V	+	+	-	-	I
16	SGS	18	F	+	+	V	-	+	-	-	II
17	APS	07	M	+	-	G	-	+	-	-	II
18	SSO	17	F	+	+	G	-	-	-	-	II
19	TF	18	F	+	+	G	+	+	-	-	I
20	RCSS	10	F	-	+	G	+	+	-	-	II
21	MLMS	15	F	-	+	V	+	+	-	-	II
22	CAS	10	M	+	-	V	+	+	-	-	II
23	APL	05	F	-	+	V	+	+	+	-	I
24	BCVS	02	F	-	+	V	-	+	-	-	I
25	MAL	18	F	+	-	V	-	+	-	-	I
26	SG	16	F	+	+	V	+	-	-	-	I
27	JDG	07	F	+	+	V	+	+	+	+	II
28	CAC	15	F	+	+	V	+	-	-	-	I
29	VA	17	F	+	-	V	-	+	-	-	I
30	KSB	13	F	+	+	G	+	+	-	-	II
31	JJS	17	M	-	-	G	+	-	-	-	II
32	RER	13	M	-	-	V	-	+	-	-	II
33	MAC	17	M	-	+	V	+	+	-	+	II
34	LCRF	06	F	+	+	V	-	+	-	-	II
35	CADL	07	F	-	-	G	+	+	-	-	II
36	DM	18	F	-	+	V	+	-	+	-	II
37	FSS	12	F	+	+	V	+	+	-	-	II
38	ECC	11	F	+	+	G	-	+	-	-	II
39	LS	14	M	-	-	V/ER	+	-	+	-	II

40	LAS	03	F	-	+	V	-	+	-	-	I
41	MPJS	11	F	+	+	V	+	+	-	-	I
42	JAS	15	M	-	+	V/ER	+	+	+	-	II
43	RCR	13	F	-	-	G	-	-	-	-	II
44	APGC	07	F	-	+	V/U	-	-	-	-	I
45	GPP	09	F	-	-	G	-	+	-	-	II
46	EHL	09	M	-	-	V	+	+	-	-	I
47	VBS	18	M	-	+	V	-	+	-	-	I
48	CEE	15	M	+	+	V	+	-	+	+	II
49	JPC	13	F	+	+	V	+	-	+	-	II
50	MSG	18	F	-	+	G/AP/ER	+	+	-	+	II
51	ECSR	18	M	+	+	V	+	+	-	-	I
52	RMV	15	F	+	+	V	-	+	-	-	II
53	BAS	35	M	-	+	V	+	+	-	-	I
54	JIP	34	M	+	+	V/AP	+	-	+	-	II
55	OAS	30	F	+	+	V	-	+	-	-	II
56	JD	35	F	-	-	V	-	+	-	-	I
57	MAOM	36	F	-	+	V	-	+	-	-	I
58	RT	28	M	-	-	V	-	+	-	-	I
59	PAB	21	M	+	+	V/AP	+	+	-	-	II
60	LRD	19	F	-	-	V	-	+	-	-	I
61	MLPF	37	F	-	-	V	-	+	-	-	I
62	MFP	25	F	-	-	V	-	+	-	-	I
63	CHP	10	M	+	-	V	-	+	+	-	I
64	LAS	3	F	-	+	V	-	+	-	-	I
65	LBS	34	F	-	-	V	-	+	-	-	I
66	LMT	28	F	-	-	V	+	+	-	-	I
67	SER	26	F	-	-	V	+	-	-	-	I
68	MPJS	11	F	+	-	V	-	-	-	-	I
69	JRL	23	M	-	+	V/AP	+	+	-	-	II

P: paciente; Início: idade de início, em anos; AF: antecedente familiar; FD: fatores desencadeantes; FC: forma clínica da doença; U: acometimento ungueal; C: acometimento do couro cabeludo; M: acometimento das mucosas; Anti-TNF: uso de etanercept; Grupo I: boa evolução; Grupo II: evolução desfavorável; V: psoríase vulgar; G: psoríase gutata; AP: artrite psoriática; ER: eritrodermia.

APÊNDICE 3

Reagentes e soluções

1. Extração de DNA

Tampão para lise de eritrócitos (lise I)

0,3M de sacarose ^c

10mM de Tris-HCl (pH = 7,5) ^c

5,0mM MgCl₂ ^c

Triton X-100 1% U.S.P. 1%

Volume final = 1L (estocagem a 4°C em local escuro)

Tampão para lise de leucócitos (lise II)

0,075 M NaCl ^b

0,024 M Na-EDTA ^c

Volume final = 1L de solução (ajuste do pH a 8,0 com NaOH ^a, estocado à temperatura ambiente)

Álcool Isopropílico (C₃H₈O) ^a

Álcool Etílico (C₂H₆O) 70%

73,6 mL de álcool etílico ^a diluídos em 26,3 mL de água bidestilada ultrapura

Estocagem à temperatura ambiente.

Cloreto de Sódio (NaCl) 6,0M, solução saturada

35,04g NaCl ^b diluídos em 100 mL de água bidestilada ultrapura

Autoclavagem a 121°C, estocagem à temperatura ambiente.

Perclorato de Sódio 0,5M

70,2g de perclorato de sódio monohidratado ^c diluídos em 100mL de água bidestilada ultrapura

Estocagem à temperatura ambiente.

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

10,0g de SDS ^c diluídos em 100mL de água bidestilada ultrapura

2. Gel de agarose e eletroforese

Gel de agarose 2%

Brometo de etídio 0,5%

Solução tris-borato – 10X (tampão de eletroforese)

0,9M tris-base ^a

0,9M Ácido Bórico ^a

0,2M Na-EDTA (pH 7,5) ^c

Volume final = 1L (estocagem à temperatura ambiente)

3. Gel de poliagrilamida e eletroforese

Solução Estoque de Acrilamida (30%)

29,0 g de acrilamida

1,0 g de bis-acrilamida diluídas em um volume final de 100mL de água. Filtrar.

Uréia P.A. (NH₂CONH₂)

Glicerol [C₃H₅(OH)₃]

Tampão TBE 10X

Tris/HCl 0,89M pH8,0

EDTA 0,08M

Ácido Bórico 0,89M.

Persulfato de potássio: solução saturada em água.

TEMED (N, N, N', N', tetrametiletilenodiamina)

Tampão de Amostra (*loading buffer*)

TBE1X

Xileno cianol 0,25%

Azul de Bromofenol 0,25%

EDTA 0,1M pH8,0

Ficoll 15%

Formamida 75%

Solução fixadora

50mL de Álcool Etilico

2mL de Ácido Acético

Água deionizada até completar 300mL

Nitrato de prata 0,1%

Nitrato de prata 0,1%

Água destilada

Formaldeído

Formaldeído 37%

100mL de água destilada na hora do uso

Revelador

4,5g de NaOH

Água deionizada até completar 200mL

^a Merck S.A. Ind. Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Synth, Labsynth Produtos para laboratórios LTDA., Diadema, SP, Brasil

^c SIGMA Chemical CO St. Louis, MO, USA

APÊNDICE 4

Tabelas dos resultados

Tabela 26: Relação dos resultados dos HLA classe I e II e SNPs TNF- α -238 e -308 dos pacientes com psoríase.

<i>P</i>		A*	B*	Cw*	DRB1*	DQB1*	-238	-308	Evol.
1	ACP	24 68	3815	12 07	04 13	03 06	GG	GG	I
2	CHP	24 68	15 38	07 12	04 13	03 06	GG	GG	I
3	ACC	36 02	53 47	04 12	11 -	06 -	GA	GG	I
4	MB	02 -	08 35	07 04	15 16	06 03	GG	GG	I
5	LBP	03 30	51 18	14 05	03 11	02 03	GA	GG	II
6	RT	02 66	58 39	07 06	04 13	03 03	GG	GG	II
7	AAS	02 -	52 58	12 06	15 11	06 03	GA	GG	I
8	EML	33 -	37 27	06 02	01 10	05 -	GG	GG	II
9	JC	03 -	39 58	12 06	11 07	03 -	GG	GG	I
10	EM	26 03	07 39	07 12	01 15	06 -	GG	GG	I
11	CMLM	02 66	41 40	03 17	13 15	06 -	GA	GG	I
12	ICC	03 01	58 27	07 02	07 11	02 03	GG	GG	I
13	DSS	02 32	39 35	12 04	04 16	03 05	GG	GG	I
14	TC	26 30	13 38	06 12	07 -	02 -	GG	GG	II
15	AFM	30 68	14 35	08 04	01 03	05 02	GG	GG	I
16	SGS	02 03	07 44	07 04	01 07	05 02	GG	GG	II
17	APS	24 -	35 39	04 12	07 12	02 03	GG	GG	II
18	SSO	02 24	14 47	04 -	04 07	03 02	GA	GG	II
19	TF	02 -	51 13	15 06	04 11	03 -	GG	GG	I
20	RCSS	02 -	51 35	14 04	03 11	02 03	GG	GG	II
21	MLMS	30 -	53 13	04 06	07 11	02 03	GA	GG	II
22	CAS	26 32	52 37	12 06	08 11	04 03	GA	GG	II
23	APL	31 -	49 50	16 07	10 15	06 05	GG	GG	I
24	BCVS	24 03	52 13	15 06	07 16	02 03	GG	GG	I
25	MAL	02 -	44 57	05 06	13 -	06 -	GA	GG	I
26	SG	11 30	41 35	17 04	01 10	05 -	GA	GG	I
27	JDG	02 24	44 57	12 06	01 07	05 02	GG	GG	II
28	CAC	02 26	55 57	03 06	07 11	03 03	GA	GG	I
29	VA	24 26	55 50	03 06	11 -	03 -	GA	GG	I
30	KSB	02 26	51 37	06 12	04 11	03 03	GG	GG	II
31	JJS	02 -	50 27	06 01	11 -	03 -	GG	GG	II
32	RER	23 -	45 50	06 07	07 13	02 06	GG	GG	II
33	MAC	02 32	39 44	12 05	11 16	03 05	GG	GG	II
34	LCRF	01 02	37 35	06 04	08 10	04 05	GG	GG	II
35	CADL	03 32	07 40	03 07	15 -	06 -	GA	GG	II

36	DM	24 -	14 39	08 12	07 16	02 06	GG	GG	II
37	FSS	02 11	51 53	02 04	01 13	05 06	GG	GG	II
38	ECC	24 -	14 38	02 12	01 13	05 06	GG	GG	II
39	LS	30 -	53 57	04 18	08 10	03 05	GG	GG	II
40	LAS	11 29	14 35	08 04	03 13	04 03	GG	GG	I
41	MPJS	24 23	45 27	06 12	01	05 03	GA	GA	I
42	JAS	01 03	37 15	06 07	11 11	03 03	GG	GG	II
43	RCR	02 24	50 57	06 -	07 13	05 -	GG	GA	II
44	APSC	01 02	35 57	04 06	16 07	03 03	GG	GG	I
45	GPP	01 34	37 58	07 06	10 11	05 03	GG	GG	II
46	EHL	01 23	07 49	07 -	10 11	05 03	GG	GG	I
47	VBS	68 -	15 40	03 -	01 04	03 05	GG	GG	I
48	CEE	23 24	44 35	12 04	07 16	02 05	GG	GG	II
49	JPC	02 -	13 15	06 03	07 16	02 03	GG	GG	II
50	MSG	01 -	14 57	08 06	16 16	05 05	GG	GG	II
51	ECSR	02 32	44 57	12 06	08 11	04 03	GA	GG	I
52	RMV	01 03	37 15	06 07	07 11	03 03	GA	GG	II
53	BAS	02 23	37 57	02 07	11 13	06 02	GA	GA	I
54	JIP	29 -	39 27	01 12	11 14	05 03	GG	GA	II
55	OAS	01 24	38 27	06 15	11 13	03 06	GG	GG	II
56	JD	02 -	57 18	06 -	07 11	03 03	GA	GG	I
57	MAOM	02 -	07 35	04 -	15 16	06 03	GG	GA	I
58	RT	- -	57 73	06 15	04 15	02 06	GA	GG	I
59	PAB	01 30	08 13	06 07	1111	03 03	GG	GA	II
60	LRD	- -	39 50	06 12	07 16	02 05	GG	GA	I
61	MLPF	32 -	53 78	04 05	11 11	03 03	GA	GG	I
62	MFP	02 -	39 57	06 12	07 13	03 06	GA	GA	I
63	CASP	11 33	55 81	03 18	09 15	02 06	GG	GA	II
64	LAS	11 29	14 35	04 08	03 13	04 03	GG	GA	I
65	LBS	02 68	35 40	04 03	16 11	03 03	GG	GG	I
66	LMT	03 -	13 15	06 08	07 11	02 05	GG	GG	I
67	SRE	30 -	58 15	06 -	11 15	03 06	GG	GA	I
69	MPJS	24 23	45 27	06 12	01 04	05 03	GA	GG	I
70	JRL	02 -	08 50	06 -	03 07	02 02	GG	GA	II

P: iniciais dos nomes dos pacientes; Evol.: evolução clínica caracterizada em grupo I e grupo II.

Tabela 27: Relação dos resultados dos HLA classe I e II e dos SNPs TNF- α -238 e -308 do grupo-controle de indivíduos sadios.

	C	A*	B*	Cw*	DRB1*	DQB1*	-238	-308
1	SEM	02 -	49 15	03 -	01 04	05 03	GA	GA
2	JARM	03 26	39 41	12 17	04 13	03 06	GA	GG
3	CRCV	03 32	52 14	12 08	15 04	06 03	GA	GG
4	MJS	03 32	40 35	04 -	01 01	05 05	GG	GA
5	JFF	01 32	27 37	06 -	07 13	02 05	GA	GG
6	AAMM	01 11	07 51	01 -	11 13	03 06	GA	GG

7	MDCV	24 33	07 39	15 -	07 16	02 05	GG	GG
8	MMN	02 -	35 -	04 12	04 12	03 03	GG	GG
9	MS	02 -	51 -	01 04	01 11	05 03	GG	GG
10	CAB	01 26	07 08	07 -	01 03	05 02	GG	GG
11	MNAS	01 33	08 14	07 08	13 03	06 02	GG	GG
12	RFD	01 24	57	06 15	03 04	02 03	GA	GG
13	JAS	02 03	44 45	05 06	11 11	03 03	GA	GG
14	MFS	02 -	44 58	16 -	13 04	06 03	GG	GG
15	MAM	03 68	51 14	15 08	01 07	05 02	GG	GG
16	ALL	02 68	44 -	05 -	04 11	03 03	GG	GG
17	ARR	02 03	27 48	02 04	11 13	06 03	GG	GG
18	SCO	02 24	51 -	03 16	15 13	06 02	GA	GG
19	FOC	02 23	15 44	05 14	04 03	02 03	GG	GG
20	CSR	01 24	07 45	06 -	15 04	06 04	GG	GG
21	CBB	02 03	58 15	06 03	03 16	02 03	GG	GG
22	OMS	26 -	07 15	03 -	15 15	06 06	GA	GA
23	ARS	24 11	44 -	02 04	01 16	05 05	GG	GA
24	BA	32 68	07 40	02 15	13 13	06 06	GG	GG
25	ALS	03 30	13 07	06 -	07 15	02 06	GG	GG
26	CASS	02 68	18 49	05 -	03 13	02 06	GG	GG
27	DAJ	01 26	38 35	06 -	01 04	05 03	GG	GG
28	OPA	02 68	35 45	04 06	04 15	03 06	GG	GG
29	JAF	29 -	14 49	08 -	01 04	05 03	GG	GG
30	RF	02 03	14 51	08 -	04 13	03 06	GG	GG
31	FFT	32 36	44 49	05 -	04 13	03 06	GG	GG
32	LMB	02 03	35 08	04 -	03 11	02 03	GG	GG
33	SAR	02 -	51 52	15 -	13 16	06 03	GG	GG
34	WCS	01 11	27 08	01 -	07 03	02 02	GA	GA
35	CSC	02 24	35 51	04 15	03 14	02 03	GG	GG
36	BJT	02 26	51 57	01 06	04 07	03 03	GA	GG
37	ALSJ	02 -	35 44	04	04 11	03 03	GG	GA
38	MAC	23 -	38 47	07 -	01 10	05 -	GG	GG
39	RSA	68 -	51 53	15 04	04 15	03 06	GG	GG
40	MPS	25 02	44 14	05 08	14 16	03 05	GG	GG
41	CPS	30 02	45 15	16 08	01 16	05 03	GA	GG
42	RPS	02 -	14 15	08 -	04 16	03 03	GA	GG
43	RPS	03 23	55 14	03 04	01 04	05 03	GG	GG
44	BFS	03 24	52 -	02, 14	11 -	03 -	GG	GG
45	ACB	11 31	38 51	12 15	11 16	03 05	GA	GG
46	CRM	01 -	38 44	12 16	07 11	02 03	GG	GG
47	CBC	01 -	47 -	04 12	04 13	03 05	GG	GG
48	SJO	24 -	35 45	04 16	01 10	05 -	GG	GA
49	MM	02 24	18 41	17	11 -	03 -	GA	GG
50	AC	02 32	15 50	04 06	11 13	03 06	GG	GG
51	MMM	02 03	07 48	04 07	09 15	03 06	GA	GA
52	MTG	03 -	08 27	01 07	01 03	02 05	GG	GA
53	FMD	02 -	35 50	04 06	07 16	03 03	GG	GA

54	BBP	02 11	40 38	02 03	03 08	02 04	GA	GA
55	GMC	01 32	08 35	04 07	11 15	03 06	GG	GA
56	JRTF	30 33	14 39	08 12	04 13	03 06	GG	GG
57	MF	02 -	07 18	07 12	01 12	03 05	GG	GG
58	BKLD	02 29	35 44	04 16	03 07	02 02	GG	GG
59	RAA	02 -	08 50	06 07	07 13	02 06	GG	GA
60	ISV	03 68	07 14	07 08	01 13	05 06	GG	GG
61	MDCF	03 66	53 57	02 04	04 07	02 03	GA	GG
62	SML	24 32	14 51	02 06	04 15	03 06	GG	GG
63	DFS	02 -	41 44	05 17	11 -	03 -	GG	GA
64	RKL	01 33	27 08	02 07	03 11	02 03	GG	GA
65	JP	02 11	35 08	04 07	13 11	06 03	GA	GA
66	LSF	02 24	35 40	04 03	10 11	05 03	GG	GG
67	AJTM	24 30	07 35	15 04	10 13	05 06	GG	GG
68	DFT	01 30	08 35	04 07	03 11	02 03	GG	GA
69	APTDR	01 02	37 15	03 06	08 11	04 03	GG	GG
70	GNBS	68 -	35 15	03 07	11 14	03 03	GG	GG

C: iniciais dos indivíduos participantes do grupo-controle.

Tabela 28: Reconstrução haplotípica dos pacientes com psoríase considerando os genótipos TNF- α -238 e -308.

	P	-238	-308	Haplótipo 1 238-308	Haplótipo 2 238-308	Evol.
1	ACP	GG	GG	G-G	G-G	I
2	CHP	GG	GG	G-G	G-G	I
3	ACC	GA	GG	G-G	A-G	I
4	MB	GG	GG	G-G	G-G	I
5	LBP	GA	GG	G-G	A-G	II
6	RT	GG	GG	G-G	G-G	II
7	AAS	GA	GG	G-G	A-G	I
8	EML	GG	GG	G-G	G-G	II
9	JC	GG	GG	G-G	G-G	I
10	EM	GG	GG	G-G	G-G	I
11	CMLM	GA	GG	G-G	A-G	I
12	ICC	GG	GG	G-G	G-G	I
13	DSS	GG	GG	G-G	G-G	I
14	TC	GG	GG	G-G	G-G	II
15	AFM	GG	GG	G-G	G-G	I
16	SGS	GG	GG	G-G	G-G	II
17	APS	GG	GG	G-G	G-G	II
18	SSO	GA	GG	G-G	A-G	II
19	TF	GG	GG	G-G	G-G	I
20	RCSS	GG	GG	G-G	G-G	II
21	MLMS	GA	GG	G-G	A-G	II
22	CAS	GA	GG	G-G	A-G	II
23	APL	GG	GG	G-G	G-G	I
24	BCVS	GG	GG	G-G	G-G	I

25	MAL	GA	GG	G-G	A-G	I
26	SG	GA	GG	G-G	A-G	I
27	JDG	GG	GG	G-G	G-G	II
28	CAC	GA	GG	G-G	A-G	I
29	VA	GA	GG	G-G	A-G	I
30	KSB	GG	GG	G-G	G-G	II
31	JJS	GG	GG	G-G	G-G	II
32	RER	GG	GG	G-G	G-G	II
33	MAC	GG	GG	G-G	G-G	II
34	LCRF	GG	GG	G-G	G-G	II
35	CADL	GA	GG	G-G	A-G	II
36	DM	GG	GG	G-G	G-G	II
37	FSS	GG	GG	G-G	G-G	II
38	ECC	GG	GG	G-G	G-G	II
39	LS	GG	GG	G-G	G-G	II
40	LAS	GG	GG	G-G	G-G	I
41	MPJS	GA	GA	G-A	A-G	I
42	JAS	GG	GG	G-G	G-G	II
43	RCR	GG	GA	G-G	G-A	II
44	APSC	GG	GG	G-G	G-G	I
45	GPP	GG	GG	G-G	G-G	II
46	EHL	GG	GG	G-G	G-G	I
47	VBS	GG	GG	G-G	G-G	I
48	CEE	GG	GG	G-G	G-G	II
49	JPC	GG	GG	G-G	G-G	II
50	MSG	GG	GG	G-G	G-G	II
51	ECSR	GA	GG	G-G	A-G	I
52	RMV	GA	GG	G-G	A-G	II
53	BAS	GA	GA	G-A	A-G	I
54	JIP	GG	GA	G-G	G-A	II
55	OAS	GG	GG	G-G	G-G	II
56	JD	GA	GG	G-G	A-G	I
57	MAOM	GG	GA	G-G	G-A	I
58	RT	GA	GG	G-G	A-G	I
59	PAB	GG	GA	G-G	G-A	II
60	LRD	GG	GA	G-G	G-A	I
61	MLPF	GA	GG	G-G	A-G	I
62	MFP	GA	GA	G-A	A-G	I
63	CASP	GG	GA	G-G	G-A	II
64	LAS	GG	GA	G-G	G-A	I
65	LBS	GG	GG	G-G	G-G	I
66	LMT	GG	GG	G-G	G-G	I
67	SRE	GG	GA	G-G	G-A	I
69	MPJS	GA	GG	G-G	A-G	I
70	JRL	GG	GA	G-G	G-A	II

Tabela 29: Reconstituição haplotípica dos indivíduos sadios do grupo-controle considerando os genótipos TNF- α -238 e -308.

	Co	-238	-308	Haplótipo 1 238-308	Haplótipo 2 238-308
1	SEM	GA	GA	G-G	A-A
2	JARM	GA	GG	G-G	A-G
3	CRCV	GA	GG	G-G	A-G
4	MJS	GG	GA	G-G	G-A
5	JFF	GA	GG	G-G	A-G
6	AAMM	GA	GG	G-G	A-G
7	MDCV	GG	GG	G-G	G-G
8	MMN	GG	GG	G-G	G-G
9	MS	GG	GG	G-G	G-G
10	CAB	GG	GG	G-G	G-G
11	MNAS	GG	GG	G-G	G-G
12	RFD	GA	GG	G-G	A-G
13	JAS	GA	GG	G-G	A-G
14	MFS	GG	GG	G-G	G-G
15	MAM	GG	GG	G-G	G-G
16	ALL	GG	GG	G-G	G-G
17	ARR	GG	GG	G-G	G-G
18	SCO	GA	GG	G-G	A-G
19	FOC	GG	GG	G-G	G-G
20	CSR	GG	GG	G-G	G-G
21	CBB	GG	GG	G-G	G-G
22	OMS	GA	GA	G-A	A-G
23	ARS	GG	GA	G-G	G-A
24	BA	GG	GG	G-G	G-G
25	ALS	GG	GG	G-G	G-G
26	CASS	GG	GG	G-G	G-G
27	DAJ	GG	GG	G-G	G-G
28	OPA	GG	GG	G-G	G-G
29	JAF	GG	GG	G-G	G-G
30	RF	GG	GG	G-G	G-G
31	FFT	GG	GG	G-G	G-G
32	LMB	GG	GG	G-G	G-G
33	SAR	GG	GG	G-G	G-G
34	WCS	GA	GA	G-A	A-G
35	CSC	GG	GG	G-G	G-G
36	BJT	GA	GG	G-G	A-G
37	ALSJ	GG	GA	G-G	G-A
38	MAC	GG	GG	G-G	G-G
39	RSA	GG	GG	G-G	G-G
40	MPS	GG	GG	G-G	G-G
41	CPS	GA	GG	G-G	A-G
42	RPS	GA	GG	G-G	A-G
43	RPS	GG	GG	G-G	G-G
44	BFS	GG	GG	G-G	G-G

45	ACB	GA	GG	G-G	A-G
46	CRM	GG	GG	G-G	G-G
47	CBC	GG	GG	G-G	G-G
48	SJO	GG	GA	G-G	G-A
49	MM	GA	GG	G-G	A-G
50	AC	GG	GG	G-G	G-G
51	MMM	GA	GA	G-G	A-A
52	MTG	GG	GA	G-G	G-A
53	FMD	GG	GA	G-G	G-A
54	BBP	GA	GA	G-G	A-A
55	GMC	GG	GA	G-G	G-A
56	JRTF	GG	GG	G-G	G-G
57	MF	GG	GG	G-G	G-G
58	BKLD	GG	GG	G-G	G-G
59	RAA	GG	GA	G-G	G-A
60	ISV	GG	GG	G-G	G-G
61	MDCF	GA	GG	G-G	A-G
62	SML	GG	GG	G-G	G-G
63	DFS	GG	GA	G-G	G-A
64	RKL	GG	GA	G-G	G-A
65	JP	GA	GA	G-A	A-G
66	LSF	GG	GG	G-G	G-G
67	AJTM	GG	GG	G-G	G-G
68	DFT	GG	GA	G-G	G-A
69	APTDR	GG	GG	G-G	G-G
70	GNBS	GG	GG	G-G	G-G

P: iniciais dos pacientes com psoríase; C: indivíduos participantes do grupo-controle; Evol: evolução.

APÊNDICE 5

Artigos enviados para Publicação

**Artigos publicados em periódicos
e anais de congresso**

HLA AND SNPs TNF-ALPHA -238 E -308 AS GENETIC MARKERS OF SUSCEPTIBILITY TO PSORIASIS AND SEVERITY OF THE DISEASE IN A LONG-TERM FOLLOW-UP BRAZILIAN STUDY

Running head: POLYMORPHISMS IN MHC AND PSORIASIS

Statement of all funding sources that supported the work

This research was supported in part by the Basic and Applied Immunology Laboratory of the Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil and Immunogenetic Transplant Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil.

Conflict of Interest Statement: none declared.

Magalhaes R.F.^{a,b}, Biral A.C.^a, Pancoto J.A.T.^c, Donadi E.A.^c, Mendes-Junior C. T.^d Magna L.A.^e and Kraemer M.H.S.^{a*}

^a Immunogenetic Transplant Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil; ^b Dermatology Division, Department of Medical Clinic; Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil; ^c Basic and Applied Immunology Laboratory, Department of Medical Clinic, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^d Department of Chemical, Faculty of Philosophy, Science and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^e Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil.

*Address for proofs and reprint requests: Prof. Dr. Maria-Helena Stangler Kraemer, Immunogenetic Transplant Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas. Tessália Vieira de Camargo, St., 126, Zip Code 13083-887, Campinas, São Paulo, Brazil. Telephone: 55 19 3521-7064, Fax: 55 19 3521-9434, e-mail: kraemer@fcm.unicamp.br

Abstract:

Background: The strongest genetic marker for psoriasis is Cw*06. Polymorphisms in the TNF-alpha promoter region, especially replacement of guanine with adenine in positions -238 and -308 are related to higher TNF-alpha production and higher risk for psoriasis in Caucasoid populations, not found in Asians. We did a case-control study of 69 patients with psoriasis type I and 70 controls, characterized clinical progression along 10-years of follow-up in mild or severe disease and determined HLA class I, II and TNF SNPs -238 and -308 polymorphisms to demonstrate whether these polymorphisms may be genetic risk for susceptibility to psoriasis or severity of the disease in Brazilians.

Methods: Polymorphisms were identified by PCR/SSP. Alleles, genotypes and haplotypes frequencies were compared by Fisher's test.

Results: More severe disease was found in male patients. It may be suggested that alleles B*37, Cw*06, Cw*12 and DRB1*07 were associated with severe disease course, while B*57 with mild disease. No statistical difference was found between the patients and controls regarding polymorphisms frequencies in TNF SNPs. This study pointed to a higher TNF-238 G/G genotype frequency (OR 3.21; CI: 1.06 – 9.71; $p=0.04$) in the group with severe disease and -238A-308G haplotype was found in reduced frequencies revealing a protective effect.

Conclusions: Polymorphisms in the TNF-alpha SNPs do not seem to be a more important genetic risk factor for psoriasis than the already known Cw*06 in Brazilian patients, but these markers may be related to clinical manifestations.

Key words: *HLA class I; HLA class II; Psoriasis; TNF-alpha, SNP -238; SNP -308.*

1. Introduction

Psoriasis is an erythematous, scaly inflammatory dermatosis with a complex immunologic basis, that includes keratinocyte hyperproliferation, aberrant differentiation of the epidermis, dermal angiogenesis, and cellular infiltrate composed mainly of activated T cells, neutrophils and mastocytes, with interaction among several proinflammatory cytokines^{1,2,3}.

The general risk of developing psoriasis is mainly associated with Cw6 or a closely related risk allele at PSORS1 (psoriasis susceptibility locus 1), with the possibility of additional interactions of alleles in linkage disequilibrium with it⁴. Disease subtypes may have different markers^{5,6}. In the Brazilian population, the association with HLA class I alleles, HLA-Cw*06, -B*13, -B*37, -B*39, -Cw*12 and HLA class II alleles, HLA-DRB3*02 and DRB1*0102 has already been demonstrated^{6,7,8}. Alternatively, the association of HLA molecules in psoriasis may be indirect and result from influence of genes in another part of the short arm of

chromosome 6, where the Major Histocompatibility Complex (MHC) region is located. Several genes located in the HLA region, including the Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF-alpha), also have an involvement in psoriasis pathogenesis⁹.

The TNF-alpha is a powerful proinflammatory cytokine that plays a vital role in inflammatory and immunological responses. It stimulates the production of other cytokines and increases the expression of adhesion molecules, neutrophil activation and antibody production. Increased cytokine levels were found in psoriasis patients on the cutaneous lesion, on the skin without lesion, in serum and in the synovial fluid of affected articulations¹⁰.

TNF-alpha gene is encoded on the chromosome 6 within MHC class III region centromerically to the HLA-B, 12 kb in length, with several polymorphic areas, including six microsatellites and several single nucleotide polymorphisms (SNP), particularly in the promoter region. The most common polymorphisms are two G to A transitions in the -308 and -238 positions, which are more prevalent in the Caucasian population¹¹. In the German population, strong association was found between polymorphisms in the -238 region of the TNF-alpha with psoriasis and psoriatic arthritis¹². No associations were found between polymorphisms in -238 and -308 regions in the Japanese¹³ and Chinese populations¹⁴.

In the present study, we observed a group of Brazilian patients with psoriasis, with 10 years of follow-up and different behavior of the disease, mild and severe forms, and evaluated whether polymorphisms in TNF promoter region may be genetic risk factor, compared with HLA class I and II polymorphisms.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and controls

About 324 individuals assisted at the Dermatology Outpatient Clinic of the Teaching Hospital, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil, with diagnosis of psoriasis were considered for the study in January 1997. Among them, 69 were selected for this study because they had regular clinical follow-up, for 10 years until January 2007, what allowed a clear classification of the clinical evolution in mild or severe disease. In order to have an 80% chance of detecting, at the 5% level of significance, a 20% difference in allelic frequency between the patient and control populations, a sample of 60 patients and 60 controls would be necessary¹⁵. So the 69 individuals sample was accepted for a case-control study (Table 1). The patients selected were those who had disease onset up to 40 years of age based in the Henseler & Christophers classification. According to the authors, type I psoriasis appears around 16 (in women) and 22 years of age (in men), has a higher tendency to an irregular course and is associated with allele HLA-Cw*06 in 85.3% of the cases. Type II appears

around 60 years of age, being related to HLA Cw6 only in 14.7%⁵. In the Brazilian population, Biral *et al* did not find association between type II psoriasis and HLA but, in type I psoriasis, the most significantly associated alleles were HLA-B*13, -B*57, Cw*06 and -Cw*12.

Analyzing the total group of 69 patients, the mean age at disease onset was 15.1 years; 21 patients (30.4%) were male and 48 (69.6%) were female. Of the 69 patients, 31 (44.9%) had first-degree relatives affected by the disease. The patients were divided into two groups according to clinical evolution criteria.

Group I was composed of patients that presented, in the course of follow-up, favorable disease evolution, that is, PASI up to 18, localized disease, without instabilities, with no need for systemic medication and even achieving lesion resolution. In this group, 36 patients were included. Of these, mean age at disease onset was 15.3 years, 7 (19.4%) were male and 29 (80.6%) were female. As regards the clinical form, there were 34 cases of psoriasis vulgaris and two of psoriasis guttata, which stabilized in the chronic form of plaques. Twelve patients (33.3%) had familial history of the disease. Within this group, there were two cases of linear psoriasis, with nevoid distribution on the lower limbs since the first months of life, that developed other psoriasiform lesions on the scalp, elbows and knees; there was good response to topic treatment and they reverted to the linear form¹⁶.

Group II was composed of 33 patients that developed extensive psoriasis, PASI higher than 18, difficult clinical control and requiring systemic treatment during follow up (methotrexate, acitretin and etanercept). The mean age of disease onset among these was 14.9 years; 14 (42.4%) were male and 19 (57.6%) were female. As to familial antecedent of psoriasis, 19 (57.6%) were positive. Among these cases of unfavorable evolution, there were 5 patients with psoriasis vulgaris who developed psoriatic arthritis, three cases of erythrodermia and 6 patients who needed anti-TNF therapy such as etanercept, for not responding to other treatments.

The control group consisted of 70 unrelated blood donors aged between 18 and 53 (mean age 30.9 years), 30 female and 40 male, from the Campinas region (State of São Paulo). Blood samples were collected from these volunteers at the Hematology and Hemotherapy Center blood bank of the State University of Campinas. At the time of collection, controls did not show any clinical psoriasis lesion or family history of the disease.

The study was previously approved by the Human Research Ethics Committee of the State University of Campinas and informed consent was obtained from all the participants.

Peripheral blood (10 ml) was collected in sterile tubes containing anticoagulant. Genomic DNA from both psoriasis patients and controls was isolated from leukocytes using a salting out procedure¹⁷.

2.2. HLA classes I and II alleles

HLA -A -B -C -DR -DQ alleles were determined using microplates containing the sequence specific primers (PCR/SSP) (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), according to the methodology developed by Olerup and Zetterquist¹⁸. PCR amplification was carried out in 30 cycles that included denaturation at 94°C for 10 seconds (s), annealing at 59°C for 60s and extension at 72°C for 30s. PCR products were analyzed by electrophoresis in ethidium bromide-stained 2% agarose gel. Presence of the specific PCR product was visualized by means of a UV transilluminator and documented by photographs.

2.3. TNF promoter polymorphisms (SNP)

The TNF promoter polymorphism -308G/A PCR amplifications were performed using specific primers for the A allele (308A – ATAGGTTTTGAGGGGCATGA) and for the G allele (308G – ATAGGTTTTGAGGGGCATGG)¹⁹ and the generic primer 308.2 – CAGGGGAAACTTCCTTGGT²⁰. All reactions were performed using internal amplification control primers HGBA.S – CGGTATTTGGAGGTCAGCAC, HGBA.A – CCCACCACCAAGACCTACTT, producing a fragment of 436 bp. The PCR reaction for the -308 SNP detection was performed in duplicates, each one with only one specific primer, producing a fragment of 259 bp.

The TNF promoter polymorphism -238G/A PCR amplifications were performed using specific primers for the A allele (238A – TCCCCATCCTCCCTGCTCT) and for the G allele (238G – CCCCCATCCTCCCTGCTCC)¹⁹ and the generic primer 308.UP – AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT²⁰. The same internal amplification control primers HGBA.S and HGBA.A were used and the PCR reaction was performed in duplicates, each one with only one specific primer, producing a fragment of 175 bp.

For both SNPs, the final volume of the reaction mixture was 10 µl, including 20 ng of genomic DNA, 0.25 mM deoxynucleoside triphosphate (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 3 pmol of one specific primer and of the generic one, 2 pmol of the internal control primers, 0.75 U DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 1x buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 50 mM KCl) and 1.5 mM of Magnesium Chloride (MgCl₂). An Applied Biosystems Thermal Cycler (Applied Biosystems 9700) was used for all PCR reactions. After an initial denaturation step of 94°C for 5 minutes, the samples were submitted to 32 cycles of 94°C for 45s, 64°C for 45s and 72°C for 1 minute, with a final extension at 72°C for 5 minutes. Amplification products were applied in denaturing vertical 12% polyacrylamide gels, submitted to specific electrophoretic conditions (250mV/1h), stained with silver and visualized according to Sanguinetti *et al*²¹. The study was carried out at the HLA-Molecular Biology

Laboratory of the School of Medical Sciences, State University of Campinas, and Basic and Applied Immunology Laboratory, State University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

2.4. Statistical analysis

The frequency of patient and control group genotypes were estimated by direct counting and comparison between group pairs by means of the two-sided Fisher's exact test, with the aid of the GraphPad InStat 3.05 software, which was also used to estimate the Odds Ratio (OR) and its 95% Confidence Interval (95%CI).

Adherences of phenotypical proportions to expectations under Hardy–Weinberg equilibrium were tested by the complete enumeration method using the ARLEQUIN 3.1 software²². To evaluate deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, we compared observed and expected frequencies by exact χ^2 -test in patients and controls.

Since both SNPs are physically linked and some samples may present two heterozygous SNPs, which results in more than one possible haplotype combination, two computational methods were used to determine the haplotypes of each subject, without taking into account any prior information: (1) the ELB algorithm²³ implemented by the ARLEQUIN 3.1 software and (2) a coalescence based method as implemented by the PHASE v2 software²⁴. The haplotype frequencies were compared between group pairs as described above.

3. Results

No departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were found.

3.1. HLA classes I e II alleles

After the allelic frequencies were determined, a comparison of patient and control frequencies was made and the statistical significance evaluated by means of the Fisher's exact test and the OR. It may be observed that HLA B*57, Cw*06, Cw*12 and DRB1*07 alleles were highly significant, with p -values lower than 0.05 (respectively $p=0.006$, OR=5.3, CI:1,4-19,1; $p=0.0001$, OR=3.9; CI:2,0-7,6; $p=0.0016$, OR=3.8; CI:1,6-8,9 and $p=0.009$, OR=2.7; CI:1,2-5,8). These alleles are, therefore, considered the main genetic risk factors for psoriasis in the studied population. The DRB1*04 allele was more frequently found in the normal controls group, with tendency to statistical significance ($p=0.095$; OR=0.49; CI: 0,2-1,0). A protective effect against the disease may be inferred.

Group I and control group were also compared, and the difference for allele B*57 was statistically significant ($p=0.008$; OR=5.7; CI:1,4-22,2). The differences

between group II and controls were statistically significant for B*37 ($p=0.005$; OR=8.18; CI:1,6-40,5), Cw*06 ($p=0.001$; OR=3.64; CI:1,6-7,8), Cw*12 ($p=0.03$; OR=2.9; CI:1,1-7,8) and DRB1*07 ($p=0.02$; OR=2.9; CI:1,2-6,8). Finally, when comparing groups I and II, allele B*37 was more present in group II with a tendency to statistical significance ($p=0.03$; OR=0.12; CI:0,01-0,09) (Table 2).

3.2. TNF promoter polymorphisms (SNP)

When patients were grouped according to the TNF genotype, it could be observed that those with more severe disease manifestations, like erythrodermia or who needed anti-TNF therapy had TNF-238 G/G and -308 G/G genotypes (Table 1).

At TNF-238 position were found, in patients and controls respectively, the GG genotype in 48 (69.6%) and 51 (72.9) and GA in 21 (30.4%) and 19 (27.1%). At TNF-308 position were found, in patients and controls respectively, GG genotype in 57 (82,6%) and 53 (75,7%), GA in 12 (17,4%) and 17 (24,3%). The AA genotype was not found. No statistical difference was observed between allele and genotype frequencies in the studied patient and control groups.

When the frequency of TNF-238 A and G alleles in group I is compared with those in group II, a tendency to statistically significant difference between them was observed. Comparing TNF-238 G/A genotypes, there was statistically significant difference between the groups (OR 3.21; 95%CI: 1.06 – 9.71; $p=0.04$). TNF -238 G/G genotype and G allele increased frequencies in group II expresses a tendency of association to the worst disease prognosis (Table 3).

TNF promoter haplotypes based on the -308 and -208 SNPs were reconstructed with the use of the ELB and PHASE methodologies resulting in inferences of TNF haplotype composition of each sample with mean probabilities of 0.975 and 0.974, respectively. Of the 139 individuals submitted to computational reconstruction, only 6.47% did not have their most probable haplotype constitutions reconstructed with a probability greater than 99%. Only 6 (4.32%) individuals had their most probable haplotypes inferred with probabilities of less than 80%. Notwithstanding that, all samples had the same haplotype combination determined by both ELB and PHASE, which makes them quite robust and highly reliable methods. Computationally reconstructed TNF -238-308 haplotype frequencies are listed below (Table 3). There was no statistically significant difference between patients and controls.

In several diseases, the association with HLA and clinical manifestation is different between genders, for example in spondyloarthropathy and HLA-B27. In the male group, severe forms were seen and 66,4% developed extensive psoriasis. The Cw*06 allele was positive in 47,6%, TNF 238 G/A genotype was found in 23,8% and TNF 308 G/A in 19,1%. In the female group, only 39,6% had

an unfavorable evolution. Cw*06 allele was positive in 54,2%, TNF 238 G/A genotype was presented in 33,3% and TNF 308 G/A in 16,6%.

4. Discussion

The long-term follow-up of these patients allowed a deeply knowledge about the disease and facilitates the characterization of well defined two groups of different psoriasis evolution.

This study suggests that allele B*57 seems to be associated with milder disease, while alleles B*37, Cw*06, Cw*12 and DRB1*07 are associated with a more severe disease course, what is consisted with other Brazilian data.

Psoriasis has a greater impact upon the quality of life and affects the socialization of both sexes equally²⁵, but severe psoriasis was more frequent in male patients in this study. In several diseases, the association with HLA and clinical manifestation is different between gender. Gender-wise analysis in children with spondyloarthropaties showed that 80% males and 20% of the female patients were HLA-B27 positive, and the disease was worst in men²⁶. In patients with acute anterior uveitis, HLA-B27 is associated with earlier systemic disease developing in males than in females²⁷. A Brazilian study with psoriatic arthritis showed a predominance of male gender (59.8%) and negative HLA-B27 (79.4%) patients, but male gender and the spondylitis subgroup were statistically associated to the positive HLA-B27²⁸.

There was no difference in frequency of Cw*06 or other HLA alleles between male and female groups in this study, but there was a tendency of significant difference in TNF-alpha - 238 G/A genotype, more frequent in the female group, the one that was more associated with a mild disease. An interaction between gender and immunogenetics may influence susceptibility to psoriasis and other diseases.

Polymorphisms in the TNF promoter region affect production of this cytokine, although the functional consequence is controversial. TNF-alpha secretion is mainly regulated by the transcriptional level and there are genetically determined interindividual differences in this process that have been related to HLA-DR haplotypes and polymorphisms in the TNF promoter region^{29,30}. A strong association between polymorphism in the -238 position with psoriasis and psoriatic arthritis^{12,30,31} has been described, although this fact was not reproduced in other studies.

The association of G/A genotypes in SNPs -238 and -308 of TNF-alpha promoter region with diseases in the Brazilian population was found in several studies, concerning obsessive-compulsive disorder³², severe forms of chagasic cardiomyopathy³³ and paucibacillary leprosy^{34,35}, for example. Other reports on severe periodontitis^{36,37} and pemphigus foliaceus³⁸ have not found association.

REICH *et al* observed, in an “in vitro” study, that the presence of allele A-238 (-238*A) was associated with increase in TNF-alpha production in patients with psoriasis of onset before 40 years of age³⁹. A study with northern Polish population confirms the association between -238 G/A TNF-alpha promoter polymorphism and early-onset psoriasis vulgaris and suggests that the -238A variant may contribute not only to a predisposition to psoriasis vulgaris but also to the disease phenotype⁴⁰.

A comprehensive metanalysis evaluated publications of case-control studies with a good level of scientific evidence, with 997 psoriasis patients and 943 controls studied regarding the TNF-238 G/A polymorphism and 1156 patients and 1083 controls that were studied regarding the -308 G/A polymorphism. It was concluded that there is a significantly increased risk conferred by the -238 G/A and A/A genotypes for the development of psoriasis, while the -308 G/A and A/A genotypes are related to decreased risk. These data should be evaluated in the different ethnic groups and may be used as biomarkers for psoriasis risk prediction⁴¹.

The intention of studying genetic particularities of psoriasis and other diseases is to find practical application of these data to improve approach to the patient. An example of this is a Swiss investigation that concluded that patients with TNF alpha -308 G/G genotype present better response to anti-TNF treatment than genotypes A/A and A/G, independently of the rheumatic disease⁴². TNF inhibiting therapy has a high cost and several side effects, mainly immunosuppression and risk for severe forms of tuberculosis. It is highly effective in rheumatoid arthritis but approximately 30 to 40% of patients do not respond well to the therapy. Therefore, it would be interesting to determine which patients would have a greater chance of deriving benefits from the treatment. Polymorphisms in the TNF promoter region may be considered biomarkers for the prognosis or prediction of therapy response⁴³.

In our Outpatient Clinic, we consider Cw*06 allele as a risk factor marker mainly for psoriasis patients' relatives, and preventive measures about environmental risk factors are applied contributing to minimize the chance of triggering the disease.

The German group defended that the TNFA -238*A allele is associated with psoriasis vulgaris in the Caucasian population, while TNFA -308*A may have a protective effect and be associated to less severe disease; the TNFA -308*A allele is decreased in psoriatic arthritis patients and may be a marker of more serious articular involvement⁴⁴. No statistical difference was found between the total group of psoriasis patients and controls in the Brazilian population regarding allele, genotype and haplotype frequencies in the TNF-alpha SNPs -238 and -308. Therefore, it does not appear to account for risk of psoriasis any better than does the already known HLA-Cw*06 in the studied population.

However, this study pointed to a higher TNF-238 G/G genotype frequency in the group with more severe disease. Moreover, the TNF-238*G allele and also presented increased frequencies in such group, although not reaching statistical significance ($p = 0.0618$; OR = 2.63, 95%CI: 0.95-7.25). Conversely, the -238A-308G haplotype was found in reduced frequencies in such group ($p = 0.0618$; OR = 0.38, 95%CI: 0.14-1.05), revealing a protective effect against a bad evolution.

These data do not correspond to those reported for the Caucasian population, considering that Brazilian population is admixed, and this is the first consideration about SNPs of TNF-alpha in psoriasis in this population. This finding might be connected more to the fact that there is admixture with Amerindians⁴⁵ forcing our results to be similar to the ones from Asian populations. It is necessary to be admitted that even in admixed populations a genetic identity is self defined that must be studied for the comprehension of the relation between that population and auto-immune diseases.

These results encourage new research on the subject with the intention of better understanding the immunogenetic profile of the Brazilian patients.

Acknowledgements

Our special thanks to the patients and healthy individuals who consented to participate in our research, to Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, Dr. Aparecida Machado de Moraes and Dr. Elemir Macedo de Souza, from the Dermatology Division for cooperating with this study.

References

1. Farber EM, Nall ML. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica* 1974; **148**:1-18.
2. Bos JD, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 1999; **20**:40-61.
3. Bowcock AM, Cookson WO. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 2004; **13**:R43-55.
4. Reich K, Hüffmeier U, König IR, Lascorz J, Lohmann J, Wendler J, Traupe H, Mössner R, Reis A, Burkhardt H. Association of psoriatic arthritis with the promoter polymorphism TNF -857 independent of the PSORS1 risk allele. *Arthritis & Rheumatism* 2007; **56**:2056-2064.
5. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985, **13**:450-6.

6. Magalhaes RF, Biral AC, Kraemer MH. Psoriasis in childhood with total remission x chronic disease: clinical application of HLA class I markers. *J Dermatol Sci* 2007; **46**:77-8.
7. Biral AC, Magalhaes RF, Wastowski IJ, Simoes R, Donadi EA, Simoes AL, Mendes-Junior CT, Tanaka AM, Kraemer MH. Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients. *Eur J Dermatol* 2006; **16**:523-9.
8. Cardoso CB, Uthida-Tanaka AM, Magalhães RF, Magna LA, Kraemer MH. Association between psoriasis vulgaris and MHC-DRB, -DQB genes as a contribution to disease diagnosis. *Eur J Dermatol* 2005; **15**:159-63.
9. Balendran N, Clough RL, Arguello JR, Barber R, Veal C, Jones AB, Rosbotham JL, Little AM, Madrigal A, Barker JN, Powis SH, Trembath RC. Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol* 1999; **113**:322-8.
10. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol* 1993; **101**:701-5.
11. D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; **39**:150-4.
12. Höhler T, Kruger A, Schneider PM, Schopf RE, Knop J, Rittner C, Meyer zum, Büschenfelde KH, Märker-Hermann E. A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol* 1997; **109**:562-5.
13. Nishibu A, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. Lack of association of TNF-238A and -308A in Japanese patients with psoriasis vulgaris, psoriatic arthritis and generalized pustular psoriasis. *J Dermatol Sci* 2002; **29**:181-4.
14. Chang YT, Tsai SF, Lee DD, Shiao YM, Huang CY, Liu HN, Wang WJ, Wong CK. A study of candidate genes for psoriasis near HLA-C in Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 2003; **148**:418-23.
15. Van Belle G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley TS. In: Biostatistics: A Methodology For the Health Sciences, 2nd Edition, ISBN: 978-0-471-03185-7, Wiley, 2004. ?
16. Magalhaes RF, Velho PE, Machado de Moraes A, Cintra ML, Biral AC, Kraemer MH, Macedo de Souza E. Linear psoriasis in Brazilian children and HLA haplotypes. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; **21**:1439-40.
17. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA for Human Nucleated Cells. *Nuclei Acids Res* 1988; **16**:1215-?
18. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2h: na alternative to serological DR typing in clinical

practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1997; **39**:225-35.

19. Marsh HP, Haldar NA, Bunce M, Marshall SE, Le Monier K, Winsey SL, Christodoulos K, Cranston D, Welsh KI, Harris AL. Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. *Br J Cancer* 2003; **89**:1096-1101.

20. Tuglular S, Berthoux P, Berthoux F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor alpha gene at position -308 and TNFd microsatellite in primary IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**:724-731.

21. Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; **17**:915-919.

22. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0. An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Onlin* 2005; **1**:47-50.

23. Excoffier L, Laval G, Balding D. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Hum Genomics* 2003; **1**:7-19.

24. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; **68**:978-89.

25. Gupta MA, Gupta AK. Age and gender differences in the impact of psoriasis on quality of life. *Int J Dermatol* 1995; **34**:700-3.

26. Sonkar GK, Usha, Singh S. Is HLA-B27 a useful test in the diagnosis of juvenile spondyloarthropathies? *Singapore Med J* 2008; **49**:795-9.

27. Braakenburg AM, de Valk HW, de Boer J, Rothova A. Human leukocyte antigen-B27 associated uveitis: long-term follow-up and gender differences. *Am J Ophthalmol* 2008; **145**:472-9.

28. Bonfiglioli R, Conde RA, Sampaio-Barros PD, Louzada-Junior P, Donadi EA, Bertolo MB. Frequency of HLA-B27 alleles in Brazilian patients with psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; **27**:709-12.

29. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, Vandenbroucke JP. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; **349**:170-3.

30. Reich K, Westphal G, Schulz T, Müller M, Zipprich S, Fuchs T, Hallier E, Neumann C. Combined analysis of polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter regions and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1999; **113**:214-20.

31. Rahman P, Siannis F, Butt C, Farewell V, Peddle L, Pellett F, Gladman D. TNF alpha polymorphisms and risk of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; **65**:919-23.

32. Hounie AG, Cappi C, Cordeiro Q, Sampaio AS, Moraes I, Rosário MC, Palácios SA, Goldberg AC, Vallada HP, Machado-Lima A, Nakano E, Kalil J, Pauls D, Pereira CA, Guilherme L, Miguel EC. TNF-alpha polymorphisms are associated with obsessive compulsive disorder. *Neurosci Lett*. Epub 2008; **442**:86-90.
33. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Cardoso MR, Braga PE, Faé KC, Nunes VL, Buck P, Mady C, Kalil J, Goldberg AC. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect* 2006; **8**:598-603.
34. Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* Epub 2002; **186**:1687-91.
35. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* 2001; **2**:196-204.
36. Maria de Freitas N, Imbronito AV, Neves AC, Nunes FD, Pustiglioni FE, Lotufo RF. Analysis of IL-1A(-889) and TNFA(-308) gene polymorphism in Brazilian patients with generalized aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw* Epub 2007; **18**:142-7.
37. Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; **29**:233-9.
38. Roxo VM, Pereira NF, Pavoni DP, Lin MT, Hansen JA, de O Poersch C, Filho AM, Petzl-Erler ML. Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus-are there any associations? *Tissue Antigens* 2003; **62**:394-400.
39. Reich K, Garbe C, Blaschke V, Maurer C, Middel P, Westphal G, Lippert U, Neumann. Response of psoriasis to interleukin-10 is associated with suppression of cutaneous type 1 inflammation, downregulation of the epidermal interleukin-8/CXCR2 pathway and normalization of keratinocyte maturation. *J Invest Dermatol* 2001; **116**:319-29.
40. Nedoszytko B, Szczerkowska-Dobosz A, Zabłotna M, Gleń J, Rebała K, Roszkiewicz J. Associations of promoter region polymorphisms in the tumour necrosis factor-alpha gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern Polish population. *Br J Dermatol* Epub 2007; **157**:165-7.
41. Li C, Wang G, Gao Y, Liu L, Gao T. TNF-alpha gene promoter -238G>A and -308G>A polymorphisms alter risk of psoriasis vulgaris: a metanalysis. *J Invest Dermatol* 2007; **127**:1886-92.

42. Seitz M, Wirthmüller U, Möller B, Villiger PM. The -308 tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFalpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology*. 46:93-6, 2007.
43. de Vlam K, Gotlieb AB, Fitzgerald O. Biological biomarkers in psoriatic disease. A review. *J Rheumatol* 2008; **35**:1443-8.
44. Mössner R, Kingo K, Kleensang A, Krüger U, König IR, Silm H, Westphal GA, Reich K. Association of TNF -238 and -308 promoter polymorphisms with psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis but not with pustulosis palmoplantaris. *J Invest Dermatol* 2005; **124**:282-4.
45. Marrero AR, Leite FPN, Carvalho BA, Peres LM, Kommers TC, Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Silva Júnior WA, Bortolini MC. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as white in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* 2005; **17**:496-506.

Table 1 – Clinical features of patients with early onset psoriasis in group I and group II and according to TNF promoter region genotypes.

Psoriasis			TNF-alpha				
GI	GII		-238 GG	GA	-308 GG	GA	TOTAL
Age							
Mean (y)	15.3	14.9	13.0	17.9	13.4	23.0	15.1
Women, n (%)			32 (66.7)	16 (76.2)	40 (70.2)	8 (66.7)	48 (69.6)
Men, n (%)			16 (33.3)	5 (23.8)	17 (29.8)	4 (33.3)	21 (30.4)
PsA			5	0	2	3	5 (7.2)
Erythrodermia			3				3 (4.3)
a				0	3	0	
Biologics							6 (8.7)
			6	0	6	0	
Fam+			12 (33.3)	19 (57.6)	18 (58,1)	13 (41,9)	27 (87,1)
Fam-			24 (66.7)	14 (42.4)	30 (78,9)	8 (21,1)	30 (78,9)
							4 (12,9)
GI			-	-	21 (43.8)	15 (71.4)	29 (50.9)
GII			-	-	27 (56.2)	6 (28.6)	28 (49.1)
							7 (58.3)
TOTAL			-	-	48	21	57
							12
							69

PsA: psoriatic arthritis; Biologic: biologic therapy; Fam+: familial antecedent present; Fam-: familial antecedent absent; GI: group I of favorable clinical evolution; GII: group II of unfavorable clinical evolution.

Table 2 – Distribution of HLA class I and II alleles frequencies between psoriasis patients and controls and group I and group II and statistical significance.

Alleles	Psoriasis	Controls	p	OR	CI 95%
HLA	(N=69) Fa%	(N=70) Fa%			
HLA-B*13	(07) 5.1	(01) 0.7	0.03	9.03	1.09-74.35
HLA-B*37	(08) 5.8	(02) 1.4	0.04	5.17	1.08-24.76
HLA-B*39	(10) 7.3	(03) 2.2	0.02	4.35	1.17-16.13
HLA-B*57	(12) 8.7	(03) 2.2	0.006	5.3	1.46-19.19
HLA-Cw*06	(36) 26.1	(14) 10.0	0.0001	3.93	2.02-7.65
HLA-Cw*12	(22) 16.0	(08) 5.7	0.0016	3.84	1.65-8.93
HLA-DRB1*04	(10) 7.3	(23) 16.4	0.095	0.49	0.23-1.09
HLA-DRB1*07	(22) 16.0	(11) 7.9	0.009	2.74	1.28-5.87
HLA-DRB1*11	(31) 22.5	(21) 15.0	0.02	2.05	1.12-3.77
GI					
(N=36) Fa%					
B*57	(08) 11.1	(03) 2.2	0.008	5.7	1.46-22.24
Cw*06	(17) 23.6	(14) 10.0	0.13	2.78	1.28-6.04
Cw*12	(12) 16.7	(08) 5.7	0.013	0.3	1.28-8.49
GII					
(N=33) Fa% (N=70) Fa%					
B*13	(04) 6.1	(01) 0.7	0.037	8.97	0.98-81.92
B*37	(07) 10.6	(02) 1.4	0.005	8.18	1.65-40.59
Cw*06	(19) 28.8	(14) 10.0	0.001	3.64	1.68-7.83
Cw*12	(10) 15.1	(08) 5.7	0.03	2.9	1.10-7.86
DRB1*04	(03) 4.5	(23) 16.4	0.02	0.24	0.07-0.84
DRB1*07	(13) 19.7	(11) 7.9	0.02	2.9	1.21-6.82
GI GII					
(N=36) Fa% (N=33) Fa%					
B*37	(01) 1.4	(07) 10.6	0.03	0.12	0.014-0.093

GI: group I of favorable clinical evolution; GII: group II of unfavorable clinical evolution; OR: Odds ratio; 95%CI: 95% Confidence Interval.

Table 3 – Distribution of G and A allele frequencies; GG, GA and AA genotypical frequencies, and haplotypes frequencies in TNF -238 and -308 promoter region, between psoriasis patients and controls and group I and group II.

	Psoriasis			Controls (n=70)	Statistically significant Comparisons
	GI (n=36)	GII (n=33)	Total (n=69)		
TNF-alpha -238 genotypes					
GG	21 (58.3) a	27 (81.8) a	48 (69.6)	51 (72.9)	a
GA	15 (41.7)	06 (18.2)	21 (30.4)	19 (27.1)	-
AA	00 (0.0)	00 (0.0)	00 (0.0)	00 (0.0)	-
TNF-alpha -238 alleles					
G	57 (79.2)	60 (90.9)	117 (84.8)	121 (86.4)	-
A	15 (20.8)	06 (9.1)	21 (15.2)	19 (13.6)	-
TNF-alpha -308 genotypes					
GG	29 (80.6)	28 (84.8)	57 (82.6)	53 (75.7)	-
GA	07 (19.4)	05 (15.2)	12 (17.4)	17 (24.3)	-
AA	00 (0.0)	00 (0.0)	00 (0.0)	00 (0.0)	-
TNF-alpha -308 alleles					
G	65 (90.3)	61 (92.4)	126 (91.3)	123 (87.9)	-
A	07 (9.7)	05 (7.6)	12 (8.7)	17 (12.1)	-
TNF-alpha - 238 -308 haplotypes					
-238A-308A	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (2.1)	-
-238A-308G	15 (20.8)	6 (9.1)	21 (15.2)	16 (11.4)	-
-238G-308A	7 (9.7)	5 (7.6)	12 (08.7)	14 (10.0)	-
-238G-308G	50 (69.4)	55 (83.3)	105 (76.1)	107 (76.4)	-

a: $p = 0.0402$; OR = 3.21, 95%CI: 1.06 – 9.71

GI: group I of favorable clinical evolution; GII: group II of unfavorable clinical evolution.

FOLLOW-UP OF PSORIASIS PATIENTS' RELATIVES: DETERMINING GENETIC MARKERS, AVOIDING ENVIRONMENT RISK FACTORS AND IMPROVING QUALITY OF LIFE

Magalhaes R.F.^{a,b}, Biral A.C.^a and Kraemer M.H.S.^{a*}

^a Immunogenetic Transplant Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil, ^b Dermatology Division, Department of Medical Clinic; Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil.

Statement of all funding sources that supported the work: this research was supported in part by the Immunogenetic Transplant Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil.

Conflict of Interest Statement: none declared.

Key words: Brazilian population; HLA class I; Psoriasis; Triggering Factors.

Abstract:

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease of unknown cause but involves the genes of the Major Histocompatibility Complex (MHC) and environmental factors such alcoholism, infections, stress and drugs. A total of 572 individuals, first-degree relatives of 324 psoriasis patients, were enrolled in an orientation program about environmental risk factors for the disease since 1997. Of these, 13 families with more than one generation affected, reaching the total of 59 individuals, were submitted to typing of HLA class I alleles and received more personalized follow-up. No new cases were observed in the studied families. Prevention measures for

*Address for proofs and reprint requests: Prof. Dr. Maria-Helena Stangler Kraemer, Immunogenetic Transplant Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Tessália Vieira de Camargo St., 126, Zip Code 13083-887, Campinas, São Paulo, Brazil. Telephone: 55 19 3521-7064, Fax: 55 19 3521-9434, e-mail: kraemer@fcm.unicamp.br

psoriasis patients and their relatives is an useful approach to getting better the quality of life of these individuals of high risk for psoriasis.

COMMENTARY

Psoriasis is an autoimmune skin disease with genetic basis associated with decreased quality of life and increased risk of cardiovascular disease. Polymorphisms in the MHC region may be mentioned for risk or prognosis in psoriasis. The intention of studying genetic particularities of psoriasis is to find practical application of these data to improve approach to the patient.

Interactions between genes and the environment are determinant for the disease onset. Several environment factors are related to psoriasis onset or exacerbation. At a site of injury it is possible to develop psoriasis, by local physical, chemical, surgical or inflammatory stimuli. Streptococcal infection, particularly of the throat, is strongly associated with acute guttate psoriasis and one-third of the cases progresses to chronic plaque psoriasis¹. The influence of hormones in psoriasis is controversial, but it is known that puberty and pregnancy may change the status of the disease.

There are many drugs reported to be responsible for the onset or exacerbation of psoriasis, like lithium, antimalarials, beta-blocking agents, non-steroidal anti-inflammatory drugs, angiotensin-converting enzyme inhibitors and the withdrawal of corticosteroids². A large case–control analysis on the U.K.-based General Practice Research Database does not support the current proposition that beta-blocker use is associated with an increased risk of psoriasis, neither other antihypertensive drugs³.

Over 60% of patients associates stress with the worsening of the disease. Alcohol may exacerbate pre-existing psoriasis. Alcohol abuse is a stress response, a consequence of the cutaneous picture and causes a reduction in therapeutic measures. Abstinence contributes to remission⁴. Smoking is associated with psoriasis onset and 2-fold increased risk of developing severe disease⁵.

Avoidance of environmental factors may postpone the disease in high-risk individuals or may decrease the severity of disease flares. But how to select

individuals at risk, do genetic triage, considering the costs involved, and design prevention programmes? Psoriasis is more prevalent in family members, a risk that may reach 25%. Our objective was to demonstrate the 10-years follow-up of a group of individuals of high risk for psoriasis, first-degree-relatives of psoriasis patients.

About 324 individuals were assisted at the Dermatology Outpatient Clinic of the Teaching Hospital, University of Campinas - UNICAMP, Sao Paulo, Brazil, with clinical diagnosis of psoriasis and were studied in the period from January 1997 to January 2007. Adding first-degree relatives, 572 individuals were enrolled in a program, including orientation, risk detection and actions on the main triggering factors. There are 13 families with more than one generation affected that were selected for genetic triage, totaling 59 individuals that have been followed for 10 years, of those 34 (56.6%) had psoriasis at the beginning of the follow-up.

The 59 individuals from affected families were submitted typing of HLA class I alleles. Genomic DNA from patients was isolated using a salting out procedure. HLA-A -B -C alleles were differentiated using sequence specific primers (PCR/SSP) (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA).

The program for psoriasis patients and their relatives is based on education about the disease. Through each evaluation, information from nurses and doctors is given to all patients, individually and with their family, including folders distribution. Specially in children and adolescents, clinical follow-up is based on detecting and treating infectious focus like amigdalitis.

Clinical follow-up for detecting weight gain, hypertension and dyslipidemia is done each six months. Nutritional orientation and regular physical activity are stimulated. In special cases, measures against smoking habit and alcohol ingestion are strongly taken, including prescription of specific medication. In individuals with unbalanced familiar situation, trouble at work or difficulties in relationships or any other behavior dysfunction, psychotherapy is suggested. The individuals with the allele HLA-Cw*06 are clinically followed including psychological support.

In these families, 34 individuals had psoriasis and the mean age of onset of the disease was 29,9 years, 18 were female and 16 were male. The clinical form

observed in the relatives was psoriasis vulgaris in 31 patients and psoriasis guttata in 3 cases. Only one patient relative with psoriasis vulgaris developed a mild arthritis during the follow-up. The disease in relatives was milder than in the patients studied, with no indication of systemic treatment in 71% of the cases.

From the 59 individuals, 17 individuals with psoriasis were Cw*06 allele positive. Six individuals with Cw*6 allele have no disease. During the 10 year-follow-up period, the incidence of new cases was stable in the studied families until now. Questionnaires about quality of life (DLQI) were applied to patients' relatives with and without psoriasis, once a year (2005, 2006 and 2007) and it was observed an improvement of quality of life even in individuals with no disease.

Psoriasis has a high incidence in the Brazilian population, around 2%, and the association with genetic markers is a known fact. Class I alleles, HLA-Cw*06, -B*13, -B*37, -B*39, -Cw*12⁶ and class II alleles, HLA-DRB3*02 and DRB1*0102⁷ have already been demonstrated in this population. The association with HLA-Cw*06 allele is well known, creating a relative risk for severe disease about 10,3 in Brazilians⁶.

There is no way to prevent the disease, but it is possible to apply the actual knowledge about the disease triggering factors for the follow-up of high risk individuals, like the psoriasis patients' relatives. In this study, we demonstrated the profile of families with more than one member affected by psoriasis and what is possible to do to improve their quality of life.

Measures to fight obesity, smoking habit and alcohol ingestion should be strict. Early detection and treatment of infections, mainly in childhood and adolescence (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Candida*, etc.) might minimize the possibility of the onset of an undesired immune response⁸. The use of certain medications that may trigger the disease, such as lithium and antimalarial, should be avoided.

It is important to acquire knowledge about psoriasis, increasing the sense of control over the disease, improving skin care practices and influencing on psychological impact⁷. The psychological and personality aspects of the patients and relatives should be considered in the follow-up. Impulsive behaviour, lack of

positive effect, alcohol abuse, sadness, helplessness and depression are attributes frequently associated with disease carriers. Programs for psoriasis should focus on self-motivation, prevention of addictive behaviour and reduction of stress using different relaxation techniques.

Using genetic information, like HLA-Cw6 allele and the familiar antecedent, measures to promote change of habits and lifestyle may be employed in the attempt to prevent disease triggers or aggravating factors.

REFERENCES

1. Abel EA, DiCicco LM, Oremberg EK *et al.* Drugs in exacerbation of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1986; **15**:1007-22.
2. Brauchli YB, Jick SS, Curtin F, Meier CR. Association between beta-blockers, other antihypertensive drugs and psoriasis: population-based case-control study. *Br J Dermatol* 2008; **158**(6):1299-307 Epub.
3. Cardoso CB, Uthida-Tanaka AM, Magalhães RF, Magna LA, Kraemer MH. Association between psoriasis vulgaris and MHC-DRB, -DQB genes as a contribution to disease diagnosis. *Eur J Dermatol* 2005; **15**(3):159-63.
4. Gupta MA, Schork NJ, Gupta AK, Ellis CN. Alcohol intake and treatment responsiveness of psoriasis: a prospective study. *J Am Acad Dermatol* 1993; **28**:730-2.
5. Magalhaes RF, Biral AC, Kraemer MH. Psoriasis in childhood with total remission x chronic disease: clinical application of HLA class I markers. *J Dermatol Sci* 2007; **46**(1):77-8
6. Fortes C, Mastroeni S, Leffondre K, et al. Relationship between smoking and the clinical severity of psoriasis. *Arch Dermatol* 2005; **141**:1580-4.
7. Telfer NR, Chalmers RJ, Whale K, Colman G. The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch Dermatol* 1992; **128**:39-42.
8. Skarpathiotakis M, Fairlie C, Ryan S. Specialized education for patients with psoriasis: a patient survey on its value and effectiveness. *Dermatol Nurs* 2006; **18**(4):358-61.

Letter to the Editor

Extensive genetic polymorphism in the haplotype STR-TNF and HLA class I with the onset and evolution of psoriasis vulgaris

Psoriasis is an inflammatory and autoimmune disease, clinically characterized by hyperproliferation of epidermis. The cause of the disease is unknown, but one of its most consistent associations involves the Major Histocompatibility Complex (MHC) and triggering factors [1]. Many genes are located in the MHC region and the most important is the tumor necrosis factor- α (TNF- α). Several polymorphisms, including microsatellites (Short Tandem Repeats – STR), were identified in the TNF- α gene found in the MHC class III region. Some studies point out that those polymorphisms are related to the production level of the TNF- α cytokine and that they play an important role in inflammatory response [2]. In the present study, Brazilian patients with psoriasis were divided according to onset of disease and the possible association of haplotypes formed by markers HLA class I genes and STR-TNF was examined. We further evaluated their role in relation to the favorable or unfavorable evolution of the disease. Typing of HLA class I and TNF (a–e) STRs was carried out in 60 patients, between 18 and 80 years of age, assisted at the outpatient dermatology clinic of the Teaching Hospital, University of Campinas, who were diagnosed according to defined clinical criteria. Diagnoses and follow-up were performed by experienced dermatologists. Based on criteria described by Henseler and Christophers for psoriasis vulgaris of early and late onset, 38 patients had type I psoriasis (PsVI) – onset before the age of 40 – and 22 patients had type II psoriasis (PsVII) – onset after the age of 40 [3]. Patients were chosen at random regarding onset of the disease. The control group consisted of 60 genetically unrelated individuals between 18 and 53 years of age who were genetically unrelated and did not show clinical psoriasis lesion and/or family history of the disease, as well as volunteers of the Hemotherapy service of the University of Campinas. Blood samples were obtained from both psoriasis patients and controls. DNA was isolated by a salting out procedure [4] and HLA-B and -C alleles were identified by sequence specific primers (PCR/SSP) [5]. The TNFa, b, c, d, and e microsatellite alleles were amplified by PCR using primers described by Udalova et al. [6] and visualized in denaturing polyacrylamide gels, in specific electrophoretic conditions.

To determine the constitutions of the two haplotypes of each individual, two different computer methods were used: EM algorithm, implemented by the HTR program and the PHASE method [7]. The frequencies of each haplotype were compared between group pairs by means of the two-sided Fisher's exact test. Computer-aided reconstruction of haplotypes was carried out in only 66 individuals (39 patients and 27 controls), since only these subjects had been fully typed for the seven polymorphisms (TNFa, TNFb, TNFc, TNFd, TNFe, HLA-B and HLA-C), as no HLAs blanks had occurred. Although no haplotype formed by the seven markers occurred with significantly distinctive frequencies, we would like to point out that six copies (11.5%) of the HLA-B*57 Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 e3 haplotype were found among the 26 PsVI patients, while just one copy (1.9%) was found among the 27 controls. Although this is the most frequent haplotype, it was not found among the 13 PsVII patients (Fig. 1). By means of the Fisher exact test, a *p*-value was found when PsVI and healthy controls were compared (*p* = 0.0579; OR = 6.913; 95% CI: 0.802–59.589). Thus, we may assume that the haplotype HLA-B*57 HLA-Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 e3 is related to PsVI susceptibility; however, a

larger sample size is needed to foster the reliability of this hypothesis.

Fifty-five out of 60 patients were followed up for over 10 years (36 PsVI and 19 PsVII). Among those, 21 developed a favorable disease evolution and showed only localized lesions restricted to at most 30% of their body surface, according to the BSA (Body Surface Area) criteria. These were controlled by topical treatment and free of instabilities or arthritis. Thirty-four patients developed extensive psoriasis that covered over 30% of their body surface, was difficult to control clinically, and required systemic treatment (Methotrexate; 8-methoxypsoralen; Acitretin).

Among the 36 PsVI patients featuring a followed-up disease development, 11 (30.6%) developed a light clinical picture; only one of them carries the extended haplotype HLA-B*57 HLA-Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 e3. However, 5 (20%) of the 25 (69.4%) PsVI patients with an unfavorable evolution carry that haplotype. Although no statistically significant difference was observed (*p* = 0.6428; OR = 2.500; 95% CI: 0.256–24.389), we could notice that the haplotype HLA-B*57 HLA-Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 e3, in addition to being related to PsVI susceptibility, showed a tendency towards being related to the development of an unfavorable evolution, since 5 of the 6 haplotypes (83.3%) were found in those patients. However, a larger sample quantity will be needed to prove that tendency.

Among the 19 PsVII patients featuring a followed-up disease development, 10 (52.6%) showed favorable evolution, while only 9 (47.4%) showed an unfavorable evolution; however, the haplotype HLA-B*57 HLA-Cw*06 TNFa2 b5 c2 d4 e3 was not detected in any of them.

In this study, we showed the association between psoriasis and the ancestral haplotype 57 (AH.57), previously related with the disease at highest frequency, composed of two HLA class I genes and STR-TNF (TNFa2c2d4/HLA-B*57, Cw*06) [8]. These results have shown susceptibility to the disease. Further, out of 6 individuals who presented AH.57 and the illness, 5 showed unfavorable evolution. Thus, it is possible to affirm that the AH, identified in these Brazilian patients, confers susceptibility and contributes to disease progression. The onset, evolution and HLA alleles/haplotypes in psoriasis have been discussed in other studies that suggested association (HLA-B*57, -B*13, -Cw*06, -Cw*12 and HLA-B*57 Cw*06, -B*13 Cw*06, -B*39 Cw*12) and prognostic of

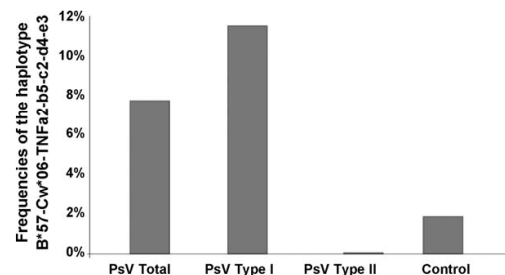


Fig. 1. Frequencies of the HLA-B*57-Cw*06-TNFa2-b5-c2-d4-e3 haplotype among PsVI (*n* = 26), PsVII (*n* = 13), total group (*n* = 39) of psoriasis patients (PsV) and the control group (*n* = 27). The haplotype frequencies were compared between group pairs using Fisher exact test, with the aid of the GraphPad InStat 3.05 software, which was also used to estimate the odds ratio and its 95% confidence interval. PsV vs. Control (*p* = 0.2393; OR = 4.417 (95% CI: 0.516–37.805)); PsVI vs. Control (*p* = 0.0579; OR = 6.913 (95% CI: 0.802–59.589)); PsVII vs. Control (*p* = 1.00; OR = 0.673 (95% CI: 0.026–17.099)).

psoriasis [9,10]. The clinical impact of these data may contribute to the prognosis and disease-specific therapies.

References

- [1] Barker JNWN. Genetic aspects of psoriasis. *Clin and Exp Dermatol* 2001;26:321–5.
- [2] Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease. *Hum Immunol* 2001;62:1191–9.
- [3] Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985;13:450–6.
- [4] Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- [5] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 h: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225–35.
- [6] Udalova IA, Nedospasov A, Webb GC, Chaplin DD, Turetskaya RL. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics* 1993;16:180–6.
- [7] Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68:978–89.
- [8] Höhler T, Grossmann S, Stradmann-Bellinghausen B, Kaluza W, Reuss E, de Vlam K, et al. Differential association of polymorphisms in the TNF α region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:213–8.
- [9] Biral AC, Magalhaes RF, Wastowski IJ, Simoes R, Donadi EA, Simoes AL, et al. Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients. *Eur J Dermatol* 2006;16:523–9.
- [10] Magalhaes RF, Biral AC, Kraemer MH. Psoriasis in childhood with total remission x chronic disease: clinical application of HLA class I markers. *J Dermatol Sci* 2007;46:77–8.

A.C. Biral^{a,*}, R.F. Magalhaes^b, I.J. Wastowski^c,
R. Simoes^c, E.A. Donadi^c, A.L. Simoes^d, C.T. Mendes-Junior^e,
M.H.S. Kraemer^a

^aImmunogenetic Transplant Laboratory, Department of Clinical
Pathology, Faculty of Medical Sciences,
University of Campinas, 13083-887 Campinas, Sao Paulo, Brazil

^bDermatology Division, Department of Medical Clinical,
Faculty of Medical Sciences, University of Campinas,
Campinas, Brazil

^cDepartment of Biochemistry and Immunology,
School of Medicine of Ribeirão Preto,
University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil

^dDepartment of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto,
University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil

^eDepartment of Chemistry, Faculty of Philosophy,
Science and Letters of Ribeirão Preto,
University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 19 35217459;
fax: +55 19 35219434

E-mail address: anabiral@yahoo.com.br (A.C. Biral)

29 July 2009

doi:10.1016/j.jdermsci.2009.05.004



ELSEVIER

LETTER TO THE EDITOR

Psoriasis in childhood with total remission × chronic disease: Clinical application of HLA class I markers

KEYWORDS

Brazilian-population; early-onset; immunogenetic markers; prognosis; psoriasis

Psoriasis is a recurrent inflammatory dermatosis, influenced by environmental factors, genetically determined, which has a multifactorial inheritance pattern [1]. Childhood psoriasis has distinct characteristics, such as atypical clinical presentation, tendency to a chronic course and extensive forms. In approximately one third of the cases, psoriasis appears in the pediatric age group and spontaneous remission may be observed in 35.3% [2]. No reference is found of the epidemiologic profile and HLA alleles of patients that suffered from psoriasis outbreaks in childhood but did not have any other sign of the disease for the rest of their lives. This investigation had the objective of carrying out a prospective study of patients who had psoriasis onset up to 18 years of age, evaluated at the moment of diagnosis and followed for up to 10 years, characterizing them as regards their HLA alleles and correlating this information with the clinical evolution of the illness.

Thirty-one patients assisted at the outpatient dermatology clinic, with diagnosis of psoriasis of onset up to 18 years of age were observed during the period of January 1995 to January 2005. The diagnosis was based on the clinical presentation, with lesions in more than 30% of the body surface area. The control group was constituted of 160 genetically unrelated individuals, between 18 and 53 years of age, voluntary blood donors at the hemotherapy service, with no connection with the patients, and did not present psoriatic clinical lesions or family antecedents of the disease.

Blood samples were taken from the patients and controls. DNA was extracted by salting out method

[3] and the HLA class I alleles were identified by DNA/PCR/SSP [4]. The allelic frequencies were obtained by direct counting. Association between alleles of patients and controls was made by χ^2 and Fisher tests.

It was observed that 23 cases (74.20%) were found among female patients and 8 (25.80%) among male patients. As to the clinical form, 23 (74.20%) were psoriasis vulgaris (PV) and 8 (25.80%) were psoriasis guttata (PG). The HLA-B*13, -B*37, -B*39, -Cw*06 and -Cw*12 alleles had significant frequencies in the group of patients with early-onset psoriasis, when compared to controls. In the Brazilian population, Biral et al. had studied 92 patients with psoriasis vulgaris, type I (onset up to 40 years of age) and type II (after 40 years of age) [5]. The HLA-B*13, -B*57, -Cw*06, and -Cw*12 alleles were significantly increased in type I psoriasis when compared to the control group, and only B*13 was significant in type II psoriasis [6]. The B*13-Cw*6 haplotypes seem to have strong association with psoriasis in Brazilians patients [6,7], and the differences between the alleles found probably is due to the considered age.

It was found that 16 of the 31 patients (51.60%) improved in 12 months, with no lesions during the observation period. Topical therapies were prescribed, like daily sunbaths, moisturizing urea 10% cream, corticoid creams and tar-derived agents. HLA-B*13 ($p < 0.02$ and $RR = 22.71$), HLA-B*39 ($p < 0.03$ and $RR = 4.52$), HLA-B*55 ($p < 0.04$ and $RR = 11.29$), HLA-Cw*6 ($p < 0.001$ and $RR = 7.00$) and HLA-Cw*12 ($p < 0.0067$ and $RR = 5.40$) alleles were found to be increased in this group. The 15 other patients (48.40%) presented persistent erythematous lesions, which showed only slight improvement with topical treatment and required systemic therapy, such as acitretin, PUVA and methotrexate. This unfavorable progression was observed during the 10-year follow-up. HLA-B*13 ($p < 0.01$ and $RR = 24.46$), HLA-B*37 ($p < 0.03$ and $RR = 12.15$), HLA-Cw*6 ($p < 0.0001$ and $RR = 10.29$) and HLA-Cw*12 ($p < 0.004$ and $RR = 6.00$) alleles were found to be increased in the group of patients that progressed with chron-

ification of psoriasis. HLA-B*55 and HLA-B*39 were frequent only in the group of patients that responded well, suggesting good prognosis, whereas HLA-B*37 seems to be associated with the more unfavorable prognosis. These data suggest that there may be a relationship between the HLA genes and the prognosis for psoriasis. The increased frequencies of certain MHC alleles are risk or protection factors for psoriasis, but other immune system alterations could also collaborate with the onset and progression of the disease. Consequently, we consider the continuity of the studies in Brazilian patients with psoriasis necessary to better assess these associations.

References

- [1] Capon F, Dellapiccola B, Novelli G. Advances in the search for psoriasis susceptibility genes. *Mol Genet Metab* 2000;71:250–5.
- [2] Ferrándiz C, Pujol RM, Garcia-Patos V, Bordes X, Smandia JA. Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:867–73.
- [3] Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- [4] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 h: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225–35.
- [5] Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985;13:450–6.
- [6] Biral AC, Magalhães RF, Kraemer MHS, et al. Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients. *Eur J Dermatol* 2006;16(5):523–9.
- [7] Biral AC, Cardoso CB, Magalhães RF, Magna LA, Uthida-Tanaka AM, Kraemer MH. 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* 2003;64(10 Suppl):S137.

R.F. Magalhães
*Department of Dermatology,
 School of Medical Science,
 State University of Campinas, Campinas,
 São Paulo, Brazil*

A.C. Biral
 M.H.S. Kraemer*
*Immunogenetic Transplant Laboratory,
 Department of Clinical Pathology,
 School of Medical Science,
 State University of Campinas, Campinas,
 São Paulo, Brazil*

*Corresponding author at:
 Immunogenetic Transplant Laboratory,
 Department of Clinical Pathology,
 School of Medical Science,
 State University of Campinas,
 Tessália Vieira Camargo St., 126,
 CEP: 13083-887,
 Campinas, São Paulo, Brazil.
 Tel.: +55 19 35217064; fax: +55 19 35219434
 E-mail address: Kraemer@unicamp.br
 (M.H.S. Kraemer)

8 April 2006

Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Linear psoriasis in Brazilian children and HLA haplotypes

Editor

Psoriasis developing since birth is very rare. We described two cases of linear psoriasis in Brazilian children and HLA class I-associated alleles. Typing of patient HLA class I alleles was carried out in a peripheral blood sample by DNA/PCR/SSP molecular method.¹

A 10-year-old girl presented erythematous and scaly lesions since birth, first seen on her right foot with upward progression during the first year of life, as a linear plaque in her inner right thigh, extending to genitalia and glutei (fig. 1). The diagnoses of linear lichen or inflammatory linear verrucous epidermal nevus (ILVEN) were proposed, and several therapy modalities were tried, with poor results. Two years later, the child presented new psoriasiform erythematous scaly plaques lesions on retroauricular region, neck, and trunk. A histopathologic examination of the linear lesion and the new lesions of the body displayed a psoriasiform dermatitis consistent with psoriasis vulgaris. The alleles found were HLA-A*02, HLA-B*08, HLA-B*35, HLA-Cw*07, and HLA-Cw*04.

Another patient, a 15-year-old boy, presented a linear erythematous patch with silvery scales on the inner right thigh, since the first weeks of life (fig. 2), with no response to topical treatments. When he was 9 years old, he pre-



fig. 1 A 10-year-old girl with linear plaque on the right thigh with psoriasiform aspect.



fig. 2 Linear erythematous scaly lesion on the inner right thigh of a 15-year-old boy.

sented small erythematous scaly lesions in the body. The diagnosis of psoriasis vulgaris in plaques was defined, corroborated by histopathologic examination. Systemic treatment with psoralen and sunlight was introduced, with great reduction in the number of lesions, whereas the initial lesion on the right thigh remained stable. HLA class I alleles were HLA-A*03, HLA-A*01, HLA-B*58, HLA-B*27, HLA-Cw*07, and HLA-Cw*02.

There are several reports of patients presenting linear psoriasiform dermatitis since first days of life, in whom, some years later, classical psoriasis vulgaris developed and there are also a few case reports of linear psoriasis that disseminated along Blaschko lines.^{2,3} Among the differential diagnoses are the overlap of epidermal naevus and psoriasis through an isomorphic phenomenon and the inflammatory epidermal naevus. In a previous study of 23 ILVEN cases, a predominance of unilateral distribution on the legs, thighs, and glutei was found, as much as onset up to 6 months of age and preponderance in males in 16 cases.⁴ There are no data in the literature that we could investigate showing a relationship between linear psoriasis and HLA class I alleles. In early-onset psoriasis, studies with different populations have shown alleles HLA-B*13 and HLA-Cw*06 to be the most frequent.⁵ We found, in Brazilian psoriasis patients, the alleles HLA-B*13, HLA-B*37, HLA-B*39, HLA-Cw*06, and HLA-Cw*12 to be more strongly associated with psoriasis of onset up to the age of 18 years.⁶⁻⁸ The HLA class I alleles findings in the patients with linear psoriasis differ from those in early onset psoriasis. They most probably present cellular mosaicism of embryological origin and a certain group of cells react differently from the others, due to chromosomal abnormalities.⁹

RF Magalhães,*† PENF Velho,† A Machado de Moraes,†
ML Cintra,‡ AC Biral,§ MHS Kraemer,§
E Macedo de Souza†

†Dermatology Division, Department of Internal Medicine,

‡Department of Pathology and §Immunogenetic Transplant
Laboratory, Department of Clinical Pathology, School of Medical
Sciences, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas,
São Paulo, Brazil,

*Corresponding author, Dermatology Division, Department of
Internal Medicine, School of Medical Sciences, UNICAMP, Rua
Tessália Vieira Camargo, 126. Barão Geraldo, Campinas, SP
13084-971, Brazil., tel. +551937887602; fax +55 1938264619;
E-mail: renatafmagalhaes@uol.com.br

References

- 1 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* 1992; **39**: 225–235.
- 2 Al-Fouzan AS, Hassab-e, I-Naby HM, Nanda A. Congenital linear psoriasis: a case report. *Pediatr Dermatol* 1990; **7**: 303–306.
- 3 Ghorpade A. Linear nevoid psoriasis along lines of Blaschko. *J EADV* 2004; **18**: 726–727.
- 4 Lee SH, Rogers M. Inflammatory linear verrucous epidermal naevi: a review of 23 cases. *Australas J Dermatol* 2001; **42**: 252–256.
- 5 Brenner W, Gschnait F, Mayr WR. HLA B13, B17, B37 and CW6 in psoriasis vulgaris: association with the age of onset. *Arch Dermatol Res* 1978; **262**: 337–339.
- 6 Kraemer MHS, Uthida-Tanaka AM, Oliveira VC *et al*. Early-onset of psoriasis in Brazilian patients: support for HLA-class I and class II analysis. In: Sirisinha S, Chaiyaroj SC, Tapchaisri P, eds. *2nd Congress of the Federation of Immunological Society of Asia-Oceania*. Monduzzi Editore, International Procedures Division, Italy, 2000; **1**: 69–73.
- 7 Biral AC, Cardoso CB, Magalhaes RF *et al*. 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* 2003; **64** (10 Suppl.): S137.
- 8 Biral AC, Magalhães RF, Kraemer MHS *et al*. Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients. *Eur J Dermatol* 2006; **16** (in press).
- 9 Happle R. Dohi Memorial Lecture: New aspects of cutaneous mosaicism. *J Dermatol* 2002; **29**: 681–692.

DOI: 10.1111/j.1468-3083.2007.02255.x

Gabapentin treatment for notalgia paresthetica, a common isolated peripheral sensory neuropathy

Editor

Notalgia paresthetica (NP) is a common, albeit infrequently reported, isolated peripheral sensory neuropathy. It is a model example for a number of neurogenic/neuropathic itches.¹ NP is characterized by pruritus on the back that may be associated with paresthesia, hypesthesia, or pain. It is usually, but not always, asymmetrical and tends to occur within the distribution of spinal nerves T2–T6.² Current therapies for this condition are not always effective. Here, we report the case of a patient with NP that was responsive to treatment with gabapentin.

An 82-year-old man was referred for evaluation of an intense, severe burning itch located in the mid-scapular region of the upper back in November 2003. He also noted itching localised to the extensor aspects of both arms. His medical history was significant for spinal stenosis, status post-corrective surgery in June 2003. The itch developed after the surgery. He denied any constitutional symptoms. Physical exam was unrevealing. CBC with differential, basic metabolic panel, thyroid-stimulating hormone, and chest X-ray were all normal, save for a slight normocytic anaemia. A diagnosis of NP with coincidental brachioradial pruritus (BRP) was made, and he was given hydrocortisone/pramoxine (2.5%) ointment for symptomatic relief. He returned in December 2003 without improvement. At this time, he was offered treatment with capsaicin but declined additional topical therapy. Instead, he requested 'pills' to treat his condition. He was given gabapentin (300 mg) to take at bedtime. After 1 month of treatment, the scapular itch improved, and his arm itching was gone. Gabapentin was increased to 600 mg at night. In May 2004, he called and stated that the itch had completely resolved until he ran out of gabapentin, at which point the pruritus returned to its original severe intensity in the scapular area only, consistent with isolated NP. He was restarted on gabapentin (600 mg) at night, and once again, the pruritus resolved. He again stopped the medication in October 2004, only to have the itch return once more. Gabapentin, at 600 mg nightly, was prescribed, and the pruritus cleared again. As of April 2005, he continued to be free of itching on 600 mg gabapentin at night.

Recent evidence implicates dorsal spinal nerve impingement or injury in the pathogenesis of NP.³ Given its presumed neural origin, many of the treatments for NP are thought to work at a neuronal level. Topical corticosteroids are generally ineffective unless secondary inflammation is present. Corticosteroids do stabilize membranes and contribute to suppression of ectopic neural pacemaker activity;

A.C. BIRAL¹
 R.F. MAGALHAES²
 L.J. WASTOWSKI³
 R. SIMOES³
 E.A. DONADI³
 A.L. SIMOES⁴
 C.T. MENDES-JUNIOR⁴
 A.M. TANAKA²
 M.H.S. KRAEMER¹

¹ Immunogenetic Transplant Laboratory,
 Clinical Pathology Department,
 School of Medical Science,
 Rua Gustavo Rodrigues Dória, 255,
 13083-060 Campinas (SP) Brazil
² Department of Dermatology;
 School of Medical Science,
 State University of Campinas, Campinas
³ Biology Molecular Laboratory,
 Medical School,
 State University of Campinas, Campinas
⁴ Department of Genetics,
 University of São Paulo, Ribeirão Preto,
 São Paulo, Brazil

Reprints: M.H.S. Kraemer
 Fax: (+19) 3788-9434
 <kraemer@fcm.unicamp.br>

Article accepted on 1/5/2006

Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients

This study investigated the genetic association of HLA class I genes and TNF- α microsatellites. HLA-A, -B, -C typing was carried out in 92 psoriasis vulgaris patients and 160 healthy individuals using a PCR-SSP method. 70 patients and 71 controls were typed for five microsatellite polymorphisms, TNFa-e. 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 type I when compared to controls, which could determine the susceptibility to development of psoriasis. TNFa4, TNFb1, TNFe1 and TNFa2 b1 c2 d4 e1 haplotypes showed a decreased frequency ($p < 0.05$) in psoriasis patients when compared to controls. HLA-B*13 allele and HLA-B*13 Cw*06, TNFa11 b4 c1 d3 e3 haplotypes showed increased frequencies ($p < 0.05$) in patients with type II psoriasis, which suggests susceptibility to the onset of psoriasis. Our results detected polymorphisms of the HLA class I and microsatellite TNF locus which could be markers of genetic predisposition to the disease.

Key words: Brazilian patients, genetic predisposition, HLA-A, -B, -C genes, microsatellites TNF, psoriasis vulgaris, risk haplotypes

Psoriasis vulgaris is a chronic inflammatory skin disorder characterized by hyperproliferation and recruitment of T lymphocytes and mononuclear cells in affected skin [1, 2]. 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 the world population varies according to ethnic groups and geographical locations, with a peak prevalence of approximately 2% of the population [3]. Among the Brazilian population, approximately 3 million individuals are affected, although the prevalence rate of the disease has not been precisely determined and probably lies between 2% and 3%. The onset of disease is called type I before the age of 40 and type II after the age of 40, which leads to the hypothesis that there are in fact two forms of psoriasis [4]. The cause of psoriasis is unknown, but its mode of inheritance 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 [5-7].

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 [8]. Several associations have been related to increased frequencies in HLA class I and II among patients of different ethnic groups [9-12]. Alternatively, the association of the

HLA molecules in psoriasis may be indirect and caused by linkage disequilibrium with a possible gene located somewhere else on chromosome 6 [13]. Many genes also located in the HLA region and whose products also suggest involvement with the pathogenesis of psoriasis include either the tumor necrosis factor- α (TNF- α) or beta (LT- α or TNF- β) [14]. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a key pro-inflammatory cytokine in the development of psoriasis, with strong biological activity. Its is regulated by the TNF gene cluster which displays a high level of polymorphism [15, 16] and is encoded within the class III region, on chromosome 6, with a length of 250kb centromeric to the HLA class genes. TNF loci are 12kb in length, contain several polymorphic areas, and include five microsatellites (Short Tandem Repeats- STR), TNFa, b, c, d and e [17]. The possible associations of HLA class I gene 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 [18]. Therefore, alleles from physically linked polymorphic loci that occupy a small chromosomal extension form useful haplotypes to infer population background, as well as for disease association studies [19].

The goal of the present study was to analyze involvement of the HLA class I region genes and TNF α microsatellites, regarding genetic predisposition to psoriasis vulgaris. Therefore, we evaluated the distribution of HLA-A, -B, -C

alleles and haplotypes as well as TNFa, b, c, d, e microsatellites in a group of patients with psoriasis vulgaris and a control group to define the associations involved with genetic risk factors for psoriasis vulgaris in Brazilian patients.

Patients and controls

Typing of HLA class I was carried out in 92 patients with psoriasis, diagnosed according to clinical criteria [20]. The 41 males and 51 females aged between 10 and 80 attended the Dermatology Ambulatory Department of the Teaching Hospital, School of Medical Sciences – State University of Campinas and were recruited between March 2002 and March 2003. All patients came from Campinas (State of São Paulo), a city located in the southeastern region of Brazil. Seventy patients had type I psoriasis and 22 patients type II psoriasis. Patients were chosen at random regarding onset of disease. Of the 92 psoriasis patients, 49 type I and 21 type II (a total of 70 patients) were studied regarding the five microsatellite markers in the TNF locus.

The control group consisted of 160 individuals aged between 18 and 53, 91 males and 69 females, from the region of Campinas. Blood samples were collected from unrelated blood donors and volunteers from the blood bank of the Hematology and Hemotherapy Centre of the State University of Campinas and typing of HLA class I genes was carried out. Of those 160 controls, 71 were chosen in order to study the five microsatellite markers in the TNF locus. The study was carried out and samples were obtained with the informed consent of patients after approval by the Research Ethics Committee.

Typing of alleles was performed at the Transplantation Immunogenetic Laboratory, Teaching Hospital, Division of Clinical Pathology, School of Medical Science – UNICAMP, which is accredited to perform clinical HLA typing by Brazilian organizations Integrated Health Service (Serviço Único de Saúde-SUS) and the Brazilian Association of Histocompatibility (ABH).

Genomic DNA extraction from peripheral blood leukocytes

Ten milliliters of heparinized blood were obtained from both psoriasis patients and controls. Genomic DNA was isolated from leukocytes in anticoagulated blood using a salting out procedure [21], 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 1.6–1.8 degree of purity and was suitable for polymerase chain reaction (PCR) analysis.

PCR/SSP typing

HLA-A, -B, -C alleles were differentiated at a medium resolution level in both psoriasis patients and controls 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 reaction specificities for HLA-B allele and 14 reactions for HLA-C allele, according to the methodology developed by Olerup and Zetterquist [22]. Amplification was carried out in 30 cycles for the PCR, that included denaturation at 94 °C for 10s, annealing at 59 °C for 60 s and extension at 72 °C for

30 s. 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 according to Udalova [23] (table 1). An Applied Biosystems 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 21 µL for all amplifications; for PCR, we used 2 µL (100 ng/µL) of genomic DNA, 10X PCR buffer, MgCl₂ (50 mM), 20 mM for each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 0.2 µM for each 3' and 5' primer and 0.10 µL for Taq Polymerase (5 U/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 [23], with small modifications in the amplification programs. Each cycle consisted of denaturation at 94 °C for 60 s, annealing at 61 °C for 60 s and extension at 72 °C for 60 s. PCR of the TNFd and TNFe loci and the second PCR of the TNFa and TNFb loci consisted of 34 cycles. Each cycle consisted of denaturation at 94 °C for 50 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 40 s. 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 [24].

Statistical analysis

Allele frequencies (AF) were calculated using the following formula: $AF (\%) = (n/2N) \times 100$, where n = sum of a particular allele and N = total number of individuals. To determine the constitutions of the two haplotypes of each individual, two different computer methods were used: the algorithm EM [25], implemented by the HTR program [26], and the PHASE method [27]. Intrapopulation haplotype diversity evaluations and exact tests to differentiate between the sample groups based on haplotype frequencies were carried out using the arlequin software program [28]. To verify the presence of alleles and haplotypes in significantly distinct frequencies among the examined groups, the frequencies of each allele and haplotype were compared between group pairs (PsV I vs. Control; PsV II vs. Control; PsV total vs. Control), using Fisher

Table 1. Primers used for TNFa 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
TNFe	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 (%) of HLA-A, -B, -C alleles, in psoriasis vulgaris patients and in controls

Allele HLA-A*	Psoriasis N = 92 n AF (%)	Control N = 160 n AF (%)	Allele HLA-B*	Psoriasis N = 92 n AF (%)	Control N = 160 n AF (%)	Allele HLA-Cw*	Psoriasis N = 92 n AF (%)	Control N = 160 n AF (%)
*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 (4.4)	19 (5.9)	*02	06 (3.3)	12 (3.8)
*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 (13.1)	46 (14.4)
*23	04 (2.2)	07 (2.2)	*15	13 (7.1)	33 (10.3)	*05	05 (2.7)	16 (5.0)
*24	16 (8.7)	31 (9.7)	*18	08 (4.4)	12 (3.8)	*06	40 (21.7)	16 (5.0)
*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 (1.9)	*08	07 (3.8)	27 (8.4)
*29	02 (1.1)	09 (2.8)	*35	16 (8.7)	28 (8.8)	*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 (2.2)	*15	04 (2.2)	17 (5.3)
*32	05 (2.7)	12 (3.8)	*39	12 (6.5)	11 (3.4)	*16	03 (1.6)	14 (4.4)
*33	04 (2.2)	11 (3.4)	*40	03 (1.6)	08 (2.5)	*17	03 (1.6)	09 (2.8)
*34	00 (0.0)	05 (1.6)	*41	03 (1.6)	03 (0.9)	*18	04 (2.2)	01 (0.3)
*36	01 (0.6)	03 (0.9)	*42	01 (0.6)	06 (1.9)			
*66	02 (1.1)	01 (0.3)	*44	06 (3.3)	33 (10.3)			
*68	07 (3.8)	19 (5.9)	*45	01 (0.6)	06 (1.9)			
*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 (2.2)			
			*50	06 (3.3)	03 (0.9)			
			*51	09 (4.9)	23 (7.2)			
			*52	04 (2.2)	07 (2.2)			
			*53	04 (2.2)	03 (0.9)			
			*55	03 (1.6)	02 (0.6)			
			*56	01 (0.6)	00 (0.0)			
			*57	16 (8.7)	06 (1.9)			
			*58	07 (3.8)	09 (2.8)			
			*67	00 (0.0)	01 (0.3)			
			*73	01 (0.6)	00 (0.0)			
			*78	00 (0.0)	01 (0.3)			
			*81	01 (0.6)	01 (0.3)			
			*82	00 (0.0)	01 (0.3)			

AF (%) = $(n/2N) \times 100$. n = sum of a particular allele. N = total number of individuals.

exact test (GraphPad in Stat, v. 3.0). 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 HLA class I alleles (HLA-A, -B, -C) using PCR/SSP

Frequency distribution of alleles found in our 92 psoriasis patients and 160 controls 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 controls, *pc* = 0.003, OR = 22.3), HLA-B*57 (8.7% in psoriasis patients vs. 1.9% in controls, *pc* = 0.02, OR = 4.9), HLA-B*44 (3.3% in psoriasis patients vs. 10.3% in controls, *p* = 0.005, OR = 0.29), HLA-Cw*06 (21.7% in psoriasis patients vs. 5.0% in controls, *pc* = 0.001, OR = 5.3), HLA-

Cw*12 (12.5% in psoriasis patients vs. 4.7% in controls, *pc* = 0.03, OR = 2.9 (table 3).

Assessment of allelic frequencies and significance in type I and II psoriasis patients showed that HLA-B*13, -B*57, -Cw*06, and -Cw*12 alleles were significantly increased in type I psoriasis (*p* < 0.05) when compared to the control group; in type II psoriasis, HLA B*13 allele was statistically significant (*pc* = 0.003, OR = 31.9) (table 3).

HLA Class I haplotypes

Haplotype frequencies were obtained through calculated probabilistic estimates. HLA-B*57 Cw*06, HLA-B*13 Cw*06 and B*39 Cw*12 haplotypes showed increased frequencies in the total psoriasis group and type I psoriasis patients when compared to the control group (table 6). Only the HLA-B*13 Cw*06 haplotype showed increased frequencies in type II psoriasis patients when compared to the controls (table 6).

Table 3. Distribution of frequencies (%) and statistical significance in HLA-A,-B, -C alleles among the total group of psoriasis patients, type I and type II psoriasis patients, and controls

Alleles HLA	PsV Total N = 92	Control N = 160	p	pc	OR
	n AF (%)	n AF (%)			
HLA-B*13	12 (6.5)	01 (0.3)	< 0.0001	0.003	22.3
HLA-B*44	06 (3.3)	33 (10.3)	0.005	ns	0.29
HLA-B*57	16 (8.7)	06 (1.9)	0.0005	0.02	4.9
HLA-Cw*06	40 (21.7)	16 (5.0)	< 0.0001	0.001	5.3
HLA-Cw*12	23 (12.5)	15 (4.7)	0.002	0.03	2.9
Alleles HLA	PsV I N = 70	Control N = 160	p	pc	OR
	n AF (%)	n AF (%)			
HLA-B*13	08 (5.7)	01 (0.3)	0.0004	0.01	19.3
HLA-B*44	05 (3.6)	33 (10.3)	0.016	ns	0.3
HLA-B*57	15 (10.7)	06 (1.9)	< 0.0001	0.003	6.3
HLA-Cw*06	35 (25.0)	16 (5.0)	< 0.0001	0.001	6.3
HLA-Cw*12	18 (12.9)	15 (4.7)	0.003	0.04	3.0
Alleles HLA	PsV II N = 22	Control N = 160	p	pc	OR
	n AF (%)	n AF (%)			
HLA-B*13	04 (9.1)	01 (0.3)	0.0009	0.03	31.9

PsV Total = Total group of psoriasis patients. PsV Type I = group of psoriasis Type I patients. PsV Type II = group of psoriasis Type II patients. Control = control group of healthy individuals. ns = not significant. p = Fisher value. pc = p-value corrected. OR = Odds ratio.

TNF microsatellite frequency distribution analyses

Table 4 shows allele frequency of the five microsatellite loci. The TNFa is the most polymorphic one, containing 14 alleles. We detected a decrease in distribution of TNFa4, b1, e1 alleles in psoriasis patients ($p = 0.03$, OR = 0.33; $p = 0.02$, OR = 0.46; $p = 0.002$, OR = 0.33) respectively, when compared with controls (table 5), which lose their significance after being corrected by the number of investigated alleles.

Distribution of allelic frequencies and significance in type I psoriasis patients were found to be decreased in TNFa4, b1, e1 alleles; however, type II psoriasis patients did not show any statistical significance, when compared to controls (table 5).

TNF microsatellite haplotypes

Frequencies of haplotypes were obtained through calculated probabilistic estimates. The TNFa2b1c2d4e1 haplotype in the total group of psoriasis patients showed decreased frequencies when compared to controls (table 6). However, our results showed increased frequency and statistical significance of the haplotype TNFa11b4c1d3e3 in type II psoriasis patients when compared to controls (table 6).

Discussion

It is now clear that the genetic basis of psoriasis is complex and that its role varies among patients and their families

Table 4. Distribution of frequencies (%) of TNF microsatellite alleles in patients (N = 70) and controls (N = 71)

Alleles	TNFa		TNFb		TNFc		TNFd		TNFe	
	PsV	Control	PsV	Control	PsV	Control	PsV	Control	PsV	Control
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 (0.08)	31 (0.21)
2	28 (0.20)	40 (0.28)	00 (0.0)	01 (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)	01 (0.007)	04 (0.03)			05 (0.03)	02 (0.01)		
7	15 (0.10)	12 (0.08)	05 (0.03)	01 (0.007)						
8	01 (0.007)	01 (0.007)								
9	06 (0.04)	03 (0.02)								
10	27 (0.19)	25 (0.17)								
11	11 (0.08)	10 (0.07)								
12	01 (0.007)	00 (0.0)								
13	09 (0.06)	04 (0.03)								
14	01 (0.007)	00 (0.0)								

AF (%) = $(n/N) \times 100$. n = sum of a particular allele. N = total number of individuals.

Table 5. Distribution of frequencies (%) and statistical significance in TNF microsatellite alleles among the total group of psoriasis patients, type I and type II psoriasis patients, and controls

Alleles STR-TNF	PsV Total N = 70	Control N = 71	p	OR
	n AF (%)	n AF (%)		
TNFA4	06 (4.3)	17 (12.0)	0.03	0.33
TNFB1	17 (12.1)	33 (23.2)	0.02	0.46
TNFE1	12 (8.6)	31 (21.8)	0.002	0.33
Alleles STR-TNF	PsV I N = 48	Control N = 71	p	OR
	n AF (%)	n AF (%)		
TNFA4	03 (3.1)	17 (12.0)	0.02	0.24
TNFB1	12 (12.2)	33 (23.2)	0.04	0.47
TNFE1	08 (8.3)	31 (21.8)	0.007	0.32
Alleles STR-TNF	PsV II N = 22	Control N = 71	p	OR
	n AF (%)	n AF (%)		
TNFA4	03 (7.1)	17 (12.0)	ns	
TNFB1	05 (12.0)	33 (23.2)	ns	
TNFE1	04 (9.5)	31 (21.8)	ns	

PsV Total = Total group of psoriasis patients. PsV Type I = group of psoriasis Type I patients. PsV Type II = group of psoriasis Type II patients. Control = control group of healthy individuals. ns = not significant. p = Fisher value. pc = p-value corrected. OR = Odds ratio.

(genetic heterogeneity) [3]. 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, HLA-Cw*06 is the allele that shows the strongest association with psoriasis [2]. Therefore, the linkage disequilibrium of the HLA system related to recombination events could modify the haplotypes which contain the HLA-Cw6. The association of that allele with the HLA-B13 or the HLA-B57 could indicate that those haplotypes, too, play a role in the susceptibility to the disease, or that another gene associated with psoriasis may be located next to those genes [29]. In the HLA-Cw6, the replacement of the amino acid alanine with tyrosine in position 73 was detected at the groove

where binding with the antigen of the HLA-C molecule occurs [30]. This finding implies that the site where the binding antigen fits into the groove of the HLA-C molecule is important for presentation of the supposed antigen associated with psoriasis [31]. From the immunological viewpoint, an abnormality of the class I molecule HLA-Cw6 may result in its being recognized by foreign antigens, with restriction of class I molecules for T-CD8 cells. Alternatively, it may lead to preferential binding of heterologous antigens and autologous antigens, or both, with subsequent recognition by T-CD8 cells [32]. When the cells expand, they begin to respond to autologous peptides, resulting in an autoimmune disease [33].

Table 6. Absolute and relative frequencies of haplotypes which showed statistical significance among the total group of psoriasis patients, type I and type II psoriasis patients, and the controls

Haplotype	Frequencies		Frequencies		p	Susceptibility or Protection
	Absolute	Relative	Absolute	Relative		
PsV I			Control			
HLA-B*57Cw*06	10	0.0909	2	0.0108	0.001	Susceptibility
HLA-B*13Cw*06	6	0.0545	0	0	0.002	Susceptibility
HLA-B*39Cw*12	8	0.0727	2	0.0108	0.007	Susceptibility
PsV II			Control			
TNF a11 b4 c1 d3 e3	6	0.1667	7	0.0565	0.044	Susceptibility
HLA-B*13Cw*06	2	0.0769	0	0	0.015	Susceptibility
PsV Total			Control			
TNF a2 b1 c2 d4 e1	10	0.0847	21	0.1694	0.037	Protection
HLA-B*13Cw*06	8	0.0588	0	0	0.001	Susceptibility
HLA-B*57Cw*06	11	0.0809	2	0.0108	0.002	Susceptibility
HLA-B*39Cw*12	8	0.0588	2	0.0108	0.016	Susceptibility

PsV total = group total of psoriasis patients. PsV Type I = group of psoriasis Type I patients. PsV Type II = group of psoriasis Type II patients. Control = control group of healthy individuals. p = Fisher value.

Studies carried out with TNF microsatellite markers examined production of TNF- α and pathogenesis of many different diseases [34, 35]. Production of TNF- α , a potent proinflammatory cytokine with marked biological activity, is regulated by the TNF locus, has many polymorphisms and is involved in inflammatory diseases [15, 16]. The polymorphisms of the TNF genes can be related to susceptibility or severity of several groups of diseases. Research on genomic extension established a strong association of psoriasis with MHC and especially the ancestral haplotype 57.1 [36]. The exact role of MHC in the pathogenesis of psoriasis is still not clear. KALUZA [37] demonstrated that the allele of promoter TNF- α , the TNF238.2, which is part of the haplotype B57.1, is often increased in psoriasis patients and is associated with a significant diminution of the transcriptional activity *in vitro*. Special attention was given to the G-A mutation for position -308; however, conflicting results were reported.

Although the STRs are usually considered to be neutral evolutionary markers, they have recently been associated with several biological processes related to genic expression. It was further suggested that the STRs function as points of recombination [38] and, depending on their location, they can also feature linkage disequilibrium with other regions of the genome, which would directly influence the control of the genic expression (e.g. promoter region). Therefore, the relationship between the polymorphisms and some diseases may be caused by the direct influence of the genetic variability on the genic expression or, further, by linkage disequilibrium of the TNF genes with other MHC genes.

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

HLA-B*13, -B*57, -Cw*06 and -Cw*12 alleles showed increased significant frequencies in the total group of patients with psoriasis and type I psoriasis; however, only the HLA-B*13 allele was significant in type II psoriasis when compared to controls. The disease occurs with a much smaller frequency after the age of 40, when compared to onset before the age of 40, and with weak correlation with HLA antigens. However, we must not forget that only a small sample (n = 22) was examined. A larger number of individuals with psoriasis should therefore be analyzed in relation of HLA class I markers to confirm that finding, which has not been reported in other studied populations.

The HLA-Cw*06 allele shows an important increase in relative risk for psoriasis in almost all the tested populations and that important frequency increase occurs in spite of the differences between genetic groups. In the present study, the frequency of patients with the allele HLA-Cw*06 was 43.4% (43.4% of patients with psoriasis compared to 10.0% of the controls, $p < 0.0001$). A strong linkage disequilibrium between the HLA-Cw*06 and 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-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06 and HLA-B*39 Cw*12 haplotypes showed a strong association with psoriasis, as well as with type I psoriasis in the present research.

Analysis of the five TNF microsatellite markers in the total group of patients with psoriasis showed a decrease in frequency of the TNFa4, b1, e1 alleles as well as of the TNFa2, b1, c2, d4, e1 haplotypes when compared to the controls. The same decreased allele frequency was found in type I psoriasis patients. Two haplotypes showed statistical significance for type II psoriasis, TNFa11 b4 c1 d3 e1 and HLA-B*13 Cw*06. These findings were not reported by any other study on psoriasis type II. However, it should be remembered that the present study examined a Brazilian population constituted by different ethnicities.

The high degree of MHC polymorphism, sequence and 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-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06 and HLA-B*39 Cw*12 haplotypes. However, the allele HLA-B*44 showed a diminished frequency with statistical significance both for the total group of patients with psoriasis and for the psoriasis type I group. This finding has been previously described and it has already been suggested that it could be a protection allele against the disease. The data confirmed findings of other studies carried out by our laboratory that suggest that there are genes of susceptibility for HLA class I [39]. Associations observed between alleles and haplotypes of the HLA class I and the STR of the TNF suggest a genetic risk for the disease, but studies should be carried out with a larger number of samples to achieve total reliability of the results found in Brazilian patients with psoriasis vulgaris. ■

Acknowledgements. Our special thanks to the patients and healthy individuals who consented in participating in our research, to the Clinical Hospital of the State University of Campinas, as well as to Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, from the Dermatology Department and to Dr. Luiz Alberto Magna, from the Medical Genetic Department, for their cooperation and numerous helpful suggestions. This research was supported in part by FAEP (Teaching and Research Support Fund), UNICAMP, and in part by the Biology Molecular Laboratory of the Medical School of University of São Paulo, Ribeirão Preto (FMRP-USP), State of São Paulo, Brazil.

References

- Farber EM, Nall I, Watson W. Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Dermatol Rev* 1974; 109: 207-11.
- Marfinez-Borra J, González S, Juanes-Santos J, Sánchez Del Rio J, Alonso-Torre JC, Vázquez-López A, Blanco-Geláz M, López-Larrea C. Psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis share a 100 kb susceptibility region telomeric to HLA-C. *Rheumatol* 2003; 42: 1089-92.
- Barker JN. Genetic aspects of psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 321-5.
- Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 450-6.
- Bowcock AM, Barker JN. Genetics of psoriasis: The potential impact on new therapies. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: S51-S56.

6. Koczan D, Guthke R, Thiesen HJ, Ibrahim SM, Kundt G, Krentz H, et al. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear leukocytes from psoriasis patients identifies new immune regulatory molecules. *Eur J Dermatol* 2005; 15: 251-7.
7. Borgiani P, Vallo L, D'Apice MR, Giardina E, Pucci S, Capon F, et al. Exclusion of CARD15/NOD2 as a candidate susceptibility gene to psoriasis in the Italian population. *Eur J Dermatol* 2002; 12: 540-2.
8. Bhalerao J, Bowcock AM. The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1537-45.
9. Elder JT, Nair RP, Guo SW, et al. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 1994; 130: 216-24.
10. Choonhakarn C, Romphruk A, Puapairoj C, Jirattananapochai K, Romphruk A, Leelayuwat C. Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais. *Int J Dermatol* 2002; 41(6): 330-4.
11. Kraemer MHS, Uthida-Tanaka AM, Oliveira VC, Biral AC, Cardoso CB, Magalhães RF, Magna LA. Early-onset of Psoriasis in Brazilian patients: Support for HLA-Class I and Class II Analysis. In: Sirisinha S, Chaiyaroj SC, Tapchaisri P, eds. *2nd Congress of the Federation of Immunological Society of Asia-Oceania*. Bologna, Italy: Monduzzi Editore, International Procedures Division, 2000; (vi: 69-73).
12. Cardoso CB, Uthida-Tanaka AM, Magalhães RF, Magna LA, Kraemer MH. Association between psoriasis vulgaris and MHC-DRB, -DQB genes as a contribution to disease diagnosis. *Eur J Dermatol* 2005; 15: 159-63.
13. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL. 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* 1997; 6: 813-20.
14. Balendran N, Clough RL, Arguello JR. Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 322-8.
15. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; 23: 224.
16. Hashiguchi 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* 2003; 64: 530-7.
17. Höhrer T, Grossmann B, Stradmann-Bellinghausen B, Kaluza W, Reuss E, Vlam de K, Veys E, Märker-Hermann E. Differential association of polymorphisms in the TNF α region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 213-8.
18. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease. *Hum Immunol* 2001; 62: 1191-9.
19. Foissac A, Salhi M, Cambon-Thomsen A. Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens* 2000; 55: 477-509.
20. Sampaio SAP, Rivitti EA. Erupções eritemato-escamosas. In: *Dermatologia, 2a ed.* São Paulo: Artes Médicas, 2000: 183-97.
21. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA for Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
22. 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* 1992; 39: 225-35.
23. Udalova IA, Nedospasov A, Webb GC, Chaplin DD, Turetskaya RI. Highly Informative Typing of the Human TNF Locus Using Six Adjacent Polymorphic Markers. *Genomics* 1993; 16: 180-6.
24. Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17: 915-9.
25. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995; 12: 921-7.
26. Zaykin DV, Westfall PH, Young SS, Karnoub MA, Wagner MJ, Ehm M.G. Testing association of statistically inferred haplotypes with discrete and continuous traits in samples of unrelated individuals. *Hum Hered* 2002; 53: 79-91.
27. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978-89.
28. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. *Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis*. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.
29. Roitberg-Tambur A, Friedmann A, Tzfoni EE, Batta S, Ben HR, Safirman C, et al. Do specific pockets of HLA C molecular predispose Jewish patients to psoriasis vulgaris? *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: 964-8.
30. Henseler T, Christophers E. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 982-6.
31. Ikaheimo 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* 1994; 131: 257-9.
32. Griffiths TW, Griffiths CEM, Voorhees JJ. Immunopathogenesis and immunotherapy of psoriasis. *Dermatol Clin* 1995; 13: 739-49.
33. Nickoloff BJ, Iurka LA, Mitra RS. Direct and indirect control of T-cell activation by keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 25-9.
34. Niizeki H, Naruse T, Hecker KH, Taylor JR, Kurimoto I, Shimizu T, Yamasaki Y, Inoko H, Streilein JW. Polymorphisms in the TNF genes are associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. *Tissue Antigens* 2001; 58: 369.
35. Weissensteiner TH, Lanchbury JS. TNFB polymorphisms characterize three lineages of TNF region microsatellite haplotypes. *Immunogenetics* 1997; 47: 6.
36. Jenisch S, Westphal E, Nair RP, Stuart P, Voorhees JJ, Christophers E, et al. Linkage disequilibrium analysis of familial psoriasis: identification of multiple disease-associated MHC haplotypes. *Tissue Antigens* 1999; 53: 135-46.
37. Kaluza W, Grossmann S, Hug R, Schopf ER, Galle PR, Maerker-Hermann E, Höhrer T. Different transcriptional activity and *in vitro* TNF α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238 A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 1180-3.
38. Biet E, Sun J, Dutreix M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 596-600.
39. Biral AC, Cardoso CB, Magalhães RF, Magna LA, Tanaka AM, Kraemer MH. Association of psoriasis with specific alleles of the HLA-B*57:06; B*13:06 haplotypes in Brazilian patients: in search of genetic susceptibility. *Hum Immunol* 2003; 64: S137.

Claudia Bueno CARDOSO¹
 Ana Maria UTHIDA-TANAKA²
 Renata Ferreira MAGALHÃES²
 Luiz Alberto MAGNA³
 Maria Helena
 Stangler KRAEMER¹

¹ Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Rua Gustavo Rodrigues Dória, 255, CEP 13083-060 Campinas – SP Brazil

² Department of Dermatology, School of Medical Sciences, State University of Campinas, Brazil

³ Medical Genetics Department, School of Medical Sciences, State University of Campinas, Brazil

Reprints: M.H.S. Kraemer
 Fax: (+55-19) 3788 9934.
 <kraemer@fcm.unicamp.br>

Association between psoriasis vulgaris and MHC-DRB, -DQB genes as a contribution to disease diagnosis

We analyzed 100 control individuals and 60 patients with psoriasis vulgaris from the population of Campinas, Brazil. Typification of class II HLA alleles (HLA-DRB1-5 and -DQB1) was carried out through the DNA/PCR/SSP at medium and high resolution. DNA was extracted through a salting-out procedure: 13 DRB1 alleles, 3 DRB3 alleles, 1 DRB4 allele, 2 DRB5 alleles, and 5 DQB1 alleles were identified at a medium resolution using the PCR/SSP, and 45 DRB1 alleles were identified at a high resolution in analyzed patients. Results showed associations with psoriasis vulgaris: positive associations HLA-DRB3*02 ($p < 0.05$, $\chi^2 = 5.10$, $RR = 2.14$); HLA-DRB1*0102 alleles ($p < 0.05$, $RR = 5.44$). Negative associations were found for HLA-DRB4*01 ($\chi^2 = 3.23$, $RR = 0.55$) and HLA-DRB1*1302 alleles ($p < 0.05$, $RR = 0.23$). The haplotypes revealed positive association for HLA-DRB1*0102/DQB1*05 ($p < 0.05$, $RR = 5.44$) and HLA-DRB1*0701/DQB1*03 alleles ($p < 0.02$, $RR = 9.00$). These findings suggest a possible association of the DRB1 allele with the group of patients showing an early onset of the illness, as well as an association with haplotypes HLA-DRB1*0102/DQB1*05 and HLA-DRB1*0701/DQB1*03.

Key words: psoriasis vulgaris, HLA-DRB, -DQB genes, MHC-association, triggering factors, Brazilian population

Article accepted on 3/1/2005

Psoriasis is a common, relapsing skin disorder of unknown cause, which is considered to be multifactorial and genetically determined [1]. It is clinically characterized as epidermal hyperproliferation, abnormal keratinocyte differentiation and inflammation (dermatosis), resulting from the infiltration of activated T helper cells and mononuclear cells into the dermis and epidermis, as well as by release of proinflammatory cytokines [2-4]. Although the pathogenesis of psoriasis remains elusive, it has recently been understood as an immunologically T cell-mediated disease, possibly autoimmune in nature [5]. The clinical phenotype of psoriasis vulgaris, including chronic plaque lesions, affects 90% of the adult patients. Its prevalence is between 1% and 2% of the population in Europe and North America but it is relatively rare among Blacks, Japanese and South Americans, absent in Eskimos and rare in Native American Indians [6]. Psoriasis affects approximately 3 million individuals in the Brazilian population, although the prevalence rate of the disease has not been precisely determined and is probably between 2% and 3%.

The genetic background of the disease, well defined but complex, has been intensively investigated in thousands of patients and matched controls, including hundreds of families of psoriasis patients and hundreds of twins [4, 7, 8]. It is probably polygenic and despite considerable research effort the genetics of psoriasis remain unclear, with the genes

involved located on several chromosomes. Furthermore, its strongest genetic association is with the HLA class I and class II genes on 6p21, which seem to play a role in disease susceptibility [9, 10]. The onset of the disease may be related to activation of TCD4+ cells and their continued activation through TCD8+ cells, providing a link with the association between MHC class I and class II [11].

The association of PsV with HLA antigen was first described in 1972 [12]; in 1980 the association of psoriasis with HLA class I alleles was demonstrated, with HLA-Cw6 as the most highly associated allele [13]. Further evidence of linkage of psoriasis to HLA-DRB – DQB alleles was provided by a variety of results in different populations; the haplotypes HLA-Cw6, HLA-B13, HLA-B57, DRB1*0701*02 and -DQB1*0303 [14] have been described in association with psoriasis in different populations from Europe, Japan, Israel and Brazil.

Our previous studies were based on serological assignment of HLA class I and class II antigens, and we investigated the association of HLA class I and class II alleles with early-onset psoriasis in patients from Campinas (Brazil), compared with the control population [15].

In this study, we used the polymerase chain reaction (PCR) – sequence-specific primers (SSP) method. This typing has proved to be sensitive and specific for medium and high-resolution and we carried out PCR/SSP typing for class II -HLA-DRB1/B3/B4/B5 and -DQB1 loci. Therefore, we

analysed the polymorphism of the HLA-DRB and DQB alleles and extended haplotype according to age of disease onset, in Brazilian patients with psoriasis.

Material and methods

Patients and controls

This study included 60 patients with psoriasis vulgaris, living in Campinas, state of São Paulo, south-eastern region of Brazil. They were randomly selected and all of them attended the Dermatology Ambulatory of the Teaching Hospital, School of Medical Sciences, State University of Campinas. Thirty-two patients were male (mean age = 51.5 years) and 28 female (mean age = 52.5 years), age range from 17 to 84 (mean age = 52 years). Patients were followed during the period 2002 to 2003.

The diagnosis of psoriasis vulgaris was established according to the following clinical criteria:

- aspect of dermatological lesion (positive spasmacetin sign and positive Auspitz sign after Brocq's methodical curettage);
- presence of one to hundreds of lesions in the form of well-defined erythematous-scaly injuries of several sizes;
- location of lesions (limbs, particularly knees and elbows, scalp, sacral region, genital mucous membranes and mucous membranes of the lips).

The control group consisted of 100 unrelated healthy adults from the region of Campinas. Blood samples were collected from blood donors and volunteers from the blood bank of the Haematology and Haemotherapy Centre of the State University of Campinas (Hemocentro). The sample consisted of 65 male (mean age = 36.8 years) and 35 female individuals (mean age = 37.4 years), age range from 19 to 63 (mean age = 37 years). The control panel is representative of the population of Campinas and corresponds fairly to the regional distribution of the patient panel.

The study was carried out and samples were obtained with the informed consent of patients after approval by the Research Ethics Committee.

Typing of HLA alleles was performed at the Transplantation Immunogenetics Laboratory – Teaching Hospital, Division of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, UNICAMP, which is accredited to perform clinical HLA typing by the Brazilian organizations Integrated Health Service (Serviço Único de Saúde – SUS) and Brazilian Association of Histocompatibility (ABH).

HLA-DR-DQ allele typing – Confirmation by PCR-SSP

DNA preparation

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes (PBL) using a salting-out method [16].

DNA typing of class II

Class II alleles were amplified by PCR using sequence specific primers and then typed. The second exons of MHC, DRB1 and DQB1 genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) as described by Zetterquist and Olerup [17], with sequence specific primers (PCR/SSP) sup-

plied by One-Lambda, Inc.-CA, USA. The DNA amplification consisted of 30 three temperature cycles that included denaturation at 94 °C for annealing and 20 cycles each for 10s at 94 °C, 50s at 59 °C and 30s at 72 °C for extension. The PCR-SSP kits used were -DR an -DQ medium and high resolution. At specific level I, medium-resolution typing, HLA-DRB1 alleles were determined by 13 primer mixes, -DRB3 by 3 primer mixes, -DRB4 by 1 primer mix, -DRB5 by 2 primer mixes and -DQB1 by 5 primer mixes. At specific level II, high-resolution typing, HLA-DRB1 alleles were determined by 224 primer mixes, -DRB3 by 16 primer mixes, -DRB4 by 1 primer mix and -DRB5 by 7 primer mixes. The PCR product was visualized using ethidium bromide-stained 2% agarose gel. Presence of specific PCR products was visualized by UV transilluminator and photographically registered [17].

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies were obtained by direct counting and calculated according to the Lamm and Degos method [18], assuming homozygosity in case of one detectable allele. Associations between each allele and each genotype found in patients and controls were compared by means of Chi-square or two-tailed Fisher's exact test. The level of significance was set to p value < 0.05 ; corrected p -values were obtained by multiplying the number of alleles tested for each locus. The strength of the observed associations was estimated by calculating the relative risk (RR) using the Woolf method, with Haldanes' continuity correction. Haplotype frequencies and linkage disequilibrium for two-loci haplotypes were calculated by applying the formula for estimation of population data.

Results

HLA-DRB3, -B4, -B5 and HLA-DQB1 alleles were determined for both psoriasis vulgaris patients and healthy controls by the medium-resolution PCR/SSP method or generic typing, whereas HLA-DRB1 alleles were determined by high-resolution or specific typing. Frequencies observed in typed alleles allowed us to conclude that the population examined is in Hardy-Weinberg equilibrium.

Allelic and genetic frequencies detected by PCR/SSP in both psoriasis vulgaris patients and healthy controls

Allelic and genetic frequencies were detected in both groups examined, by the medium and high-resolution PCR/SSP methods. 114 DRB1 alleles, 51 DRB3 alleles, 23 DRB4 alleles, 18 DRB5 alleles, and 114 DQB1 were found. In the healthy control group, 190 DRB1 alleles, 72 DRB3 alleles, 53 DRB4 alleles, 26 DRB5 alleles, and 190 DQB1 alleles were detected.

Association with HLA-DRB and DQB1 alleles

HLA-DRB3*02 and HLA-DRB1*0102 alleles showed increased frequency in patients when compared to healthy controls: HLA DRB3*02 ($p = 46.7\%$, $c = 29\%$, $\chi^2 = 5.10$, $p < 0.05$, $RR = 2.14$); HLA-DRB1* 0102 ($p = 10\%$, $c = 2\%$, $p < 0.05$, $RR = 5.44$), respectively (table 1). We further observed a decrease in the following allele frequencies in patients when compared to healthy controls: HLA-DRB1*04 ($p = 15\%$, $c = 35\%$, $\chi^2 = 7.52$, $p < 0.05$, $RR = 0.33$); HLA-DRB1*1302 ($p = 3.3\%$, $c = 13\%$,

Table 1. Distribution - HLA-DRB1 e DQB1, RR, χ^2 , p-value

Gene	Allele	Controls		Psoriasis vulgaris patients		RR	χ^2	p-value
		n(%)	frequency	n(%)	frequency			
DRB1	*0101	17(17)	0.0890	5(8.3)	0.0423	0.44	2.38	0.1570
	*0102	2(2.0)	0.0100	6(10.0)	0.0513	5.44	-	0.0533
	*0103	2(2.0)	0.0100	1(1.7)	0.0080	0.83	-	1.0000
	*1501	9(9.0)	0.0460	8(13.3)	0.0688	1.56	0.74	0.3892
	*1502	2(2.0)	0.0100	1(1.7)	0.0080	0.83	-	1.0000
	*1503	3(3.0)	0.0151	3(5.0)	0.0253	1.70	-	0.6725
	*1504	1(1.0)	0.0050	0(0.0)	0.0000	0.00	-	1.0000
	*1601	7(7.0)	0.0356	3(5.0)	0.0253	0.70	-	0.7444
	*1602	4(4.0)	0.0202	3(5.0)	0.0253	1.26	-	1.0000
	*0301	12(12)	0.0619	11(18.3)	0.0962	1.65	1.22	0.2694
	*0302	1(1.0)	0.0050	1(1.7)	0.0083	1.68	-	1.0000
	*0401	8(8.0)	0.0408	2(3.3)	0.0167	0.40	-	0.3227
	*0402	3(3.0)	0.0151	1(1.7)	0.0080	0.55	-	1.0000
	*0403	4(4.0)	0.0202	1(1.7)	0.0083	0.41	-	0.6511
	*0404	7(7.0)	0.0356	2(3.3)	0.0167	0.46	-	0.4854
	*0405	8(8.0)	0.0408	1(1.7)	0.0083	0.19	-	1.0000
	*0407	1(1.0)	0.0050	0(0.0)	0.0000	0.00	-	1.0000
	*0408	2(2.0)	0.0100	0(0.0)	0.0000	0.00	-	0.5283
	*0410	1(1.0)	0.0050	0(0.0)	0.0000	0.0	-	1.0000
	*0411	1(1.0)	0.0050	2(3.3)	0.0167	3.41	-	0.5567
	*0432	0(0.0)	0.0000	1(1.6)	0.0080	0.00	-	0.3750
	*1101	18(18)	0.0945	10(16.7)	0.0870	0.91	0.05	0.8299
	*1102	2(2.0)	0.0100	3(5.0)	0.0253	2.58	-	0.3643
	*1103	2(2.0)	0.0100	2(3.3)	0.0167	1.69	-	0.6310
	*1104	4(4.0)	0.0202	4(6.7)	0.0338	1.71	-	0.4745
	*1110	1(1.0)	0.0050	0(0.0)	0.0000	0.00	-	1.0000
	*1118	0(0.0)	0.0000	1(1.7)	0.0080	0.00	-	0.3750
	*1201	1(1.0)	0.0050	2(3.3)	0.0167	3.41	-	0.5567
	*1301	8(8.0)	0.0408	6(10.0)	0.0513	1.28	0.19	0.6647
	*1302	13(13.0)	0.0673	2(3.3)	0.0167	0.23	-	0.0508
	*1303	2(2.0)	0.0100	3(5.0)	0.0253	2.58	-	0.3643
	*1305	1(1.0)	0.0050	1(1.7)	0.0083	1.68	-	1.0000
	*1309	1(1.0)	0.0050	0(0.0)	0.0000	0.00	-	1.0000
	*1315	0(0.0)	0.0000	1(1.7)	0.0083	0.00	-	0.3750
	*1320	0(0.0)	0.0000	1(1.7)	0.0083	0.00	-	0.3750
	*1327	1(1.0)	0.0050	0(0.0)	0.0000	0.00	-	1.0000
	*1401	5(5.0)	0.0253	3(5.0)	0.0253	1.00	-	1.0000
	*1402	2(2.0)	0.0100	0(0.0)	0.0000	0.00	-	0.5283
	*0701	20(20.0)	0.1055	11(18.3)	0.0962	0.90	0.07	0.7962
	*0801	8(8.0)	0.0408	3(5.0)	0.0253	0.61	-	0.5383
	*0804	1(1.0)	0.0050	1(1.7)	0.0083	1.68	-	1.0000
	*0809	1(1.0)	0.0050	0(0.0)	0.0000	0.00	-	1.0000
	*0816	0(0.0)	0.0000	2(3.3)	0.0167	0.00	-	0.1392
	*0901	2(2.0)	0.0100	2(3.3)	0.0167	1.69	-	0.6310
	*1001	2(2.0)	0.0100	4(6.7)	0.0338	3.50	-	0.1983

$p < 0.05$, $RR = 0.23$) (table 1). In contrast, the HLA-DQB1 alleles did not show any significant association with psoriasis (table 2).

Association with HLA-DRB1 and DQB1 haplotypes

We detected two haplotypes positively associated with psoriasis: DRB1*0102 DQB1*05 ($p = 10.0\%$, $c = 2.0\%$, $p < 0.05$, $RR = 5.44$) and DRB1*0701 DQB1*03 ($p = 8.3\%$, $c = 1.0\%$, $p < 0.02$, $RR = 9.00$), as well as one

haplotype negatively associated with the disease, DRB1*0405 DQB1*03 ($p = 0.0\%$, $c = 7.0\%$, $p < 0.04$ and $RR = 0.10$) (table 3).

Discussion

The presence of disease genes in the HLA region has long been suspected on the basis of HLA-association studies

Table 2. Positive associations found for HLA-DRB, -DQB1 alleles and haplotypes, detected by SSP in Psoriasis vulgaris patients

Positive associations with HLA-DRB1*0102 and DRB3*02 alleles			
HLA alleles	χ^2	p-value	Relative risk
DRB1*0102	5.10	0.0533	5.44
DRB3*02		0.0239 <i>pc</i> = ns	2.14
Positive associations with haplotypes:			
HLA-DRB1*0102/DQB1*05			
Haplotype		p-value	Relative risk
DRB1*0102/DQB1*05		0.0533	5.44
HLA-DRB1*0701/DQB1*03			
Haplotype		p-value	Relative risk
DRB1*0701/DQB1*03		0.0281	9.00

Ns = not significant.

Table 3. Negative associations found for HLA-DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes, detected by SSP in psoriasis vulgaris patients

Negative associations with HLA-DRB1*1302 and DRB1*04 alleles			
Haplotype		p-value	Relative risk
DRB1*1302		0.0508	0.23
DRB1*04	7.52	0.0061 <i>pc</i> = ns	0.33
Negative associations with haplotype:			
HLA- DRB1*0405/DQB1*03			
Haplotype		p value	Relative risk
DRB1*0405/DQB1*03		0.0459	0.00

Ns = not significant.

[19]; nevertheless, the precise genetic basis of HLA association in psoriasis vulgaris has remained elusive. Since then numerous association studies performed typically used HLA phenotypes or genotypes as markers [20]. However, the identification of the genetic course of these associations can cause extreme difficulties [21]. Regarding HLA gene associations, many studies have described increased frequencies of class I HLA alleles, and there is substantial evidence suggesting that psoriasis is strongly associated with HLA-CW6 in many populations [22, 23]. Because not all patients with psoriasis carry HLA-CW6, it has been proposed that class II HLA alleles are also involved in psoriasis susceptibility. Choonhakarn, [24] describes the association of Type I psoriasis with the HLA-DRB1*07-DQB1*03; another research group [25] demonstrated that HLA-DRB1*0701 and HLA-DRB1*1401 were significantly increased in a Taiwanese population.

We demonstrated in a previous report on Brazilian psoriasis patients that human leukocyte antigen HLA-A1,-A2, -CW6,-CW7, eHLA-DR7,-DQ5, showed significantly higher frequencies in psoriasis patients than in healthy controls. The present study investigated the molecular genetic basis of psoriasis on human chromosome 6, a class II region. Our results revealed two positively associated alleles in analyzed patients: DRB1*0102 ($p < 0.05$, $RR = 5.44$) and -DRB3*02 ($p < 0.02$, $\chi^2 = 4.36$, $RR = 2.14$). Particular attention was given to the analyzed two-loci haplotypes in

the group of psoriasis patients and we found that the HLA-DRB1*0102/DQB1*05 haplotype ($p < 0.05$ and $RR = 5.44$) and the HLA-DRB1*0701/DQB1*03 haplotype ($p < 0.02$ and $RR = 9.00$) were equally and significantly associated with psoriasis vulgaris, with a significant difference to those of the controls. The strong association found in the HLA-DRB1*0701/DQB1*03 haplotype was also found in psoriasis vulgaris patients in Germany [26]. We have seen protective MHC alleles and haplotypes in this study: HLA-DRB1*1302 allele ($p < 0.05$, $RR = 0.23$) and HLA-DRB1*04 allele ($\chi^2 = 6.55$, $p < 0.01$ and $RR = 0.33$), as well as the HLA-DRB1*0405/DQB1*03 haplotype ($p < 0.04$ and $RR = 0.00$) were shown to have a protective effect against the development of psoriasis vulgaris in the patients examined. The DRB1*0701/DQB1*03 haplotype and the HLA-DRB1*0102/DQB1*05 haplotype were found in 100% of the patients with an early onset of the disease (< 40 years old). These data are important due to the fact that haplotypes containing the DR7 gene play an important role in psoriasis inheritance and were identified as high-risk haplotypes in patient groups with early-onset disease [24]. It seems that the proper interpretation of association studies strongly depends upon knowledge of the population structure including the possibility that the disease allele might have arisen independently on multiple occasions [27].

In conclusion, the present study allows us to determine significant association between HLA-DRB1*0102/DQB1*05 and HLA-DRB1*0701/DQB1*03 haplotypes and a group of psoriasis vulgaris patients with early onset of the disease. Regarding further allelic and haplotype associations observed, our data suggests susceptibility genes as possible triggering factors for the disease. ■

Acknowledgements. We thank the patients and the healthy individuals who participated in this study, as well as Dr. Maria Beatriz Puzzi, from the Dermatology Department, Dr Arthur Makoto Sakamoto, Dr. Vera Cecilia Oliveira and Dr. Ana Maria Biral, from the Clinical Pathology Department, for their cooperation. We also wish to acknowledge the assistance of Biometrix and the Teaching Hospital of the School of Medical Sciences – Unicamp – State University of Campinas. This work was supported by award from FAPESP – São Paulo State Research Foundation and grant from FAEP – Research and Teaching Support Fund.

References

1. Bowcock AM, Cookson WOCM. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 43-55.
2. Burch PR, Rowell NR. Psoriasis: aetiological aspects. *Acta Derm Venerol* 1965; 45: 366-80.
3. Christophers E. The immunopathology of psoriasis. *Int Arch Allergy* 1996; 110: 199-206.
4. McKusick VA. Psoriasis, susceptibility to no. 177900 OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man. Internet. <http://www.ncbi.nih.gov/hlbin/post/Omim/dispim?142840>, 1997.

5. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 1-8.
6. Farber EM, Nall L. Epidemiology: natural history and genetics. In: Roenigk HH, Maibach HI, eds. *Psoriasis*. 2nd edn. New York: Marcel Dekker, 1991: 209-58.
7. Lomholt G. *Psoriasis: Prevalence, Spontaneous Course and Genetics: a Census Study in the Prevalence of Skin Diseases on the Faroe Islands*. Copenhagen: GEC Gad, 1963.
8. Henseler T. The genetics of psoriasis. *J Am Dermatol* 1997; 37: S1-S11.
9. Nair RP, Henseler T, Jenish S, Stuart P. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA ad 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Genet* 1997; 6: 1349-56.
10. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL. 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* 1997; 6: 813-20.
11. Gottlieb AB, Krueger JG. Role of T-lymphocytes (in psoriasis pathogenesis). In: Dubertret L, ed. *Psoriasis*. Brescia: ISED, 1994: 63-71.
12. Russel TJ, Schultes LM, Kuban DJ. Histocompatibility (HLA-A) antigens with psoriasis. *N Engl J Med* 1972; 287: 738-43.
13. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, et al. Psoriasis and HLA - Cw6. *Br J Dermatol* 1980; 102: 179-84.
14. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of Psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 450-6.
15. Kraemer MHS, Uthida-Tanaka AM, Oliveira VC, Biral AC, Cardoso CB, Magalhães RF, Magna LA. Early-onset of Psoriasis in Brazilian patients: Support for HLA-Class I and II Analysis. In: Sirisinha S, Chaiyaroj SC, Tapchaisri P, eds. *2nd Congress of the Federation of Immunological Society of Asia-Oceania*. Bologna, Italy: Monduzzi Editore, International Procedures Division, 2000: 69-73; V1.
16. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple Salting out Procedure for Extracting DNA for Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
17. Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1*04, -DRB1*07, and -DRB1*09 alleles by amplification with sequence-specific primers (SSP) in 2 hours. *Hum Immunol* 1992; 34(1): 64-74.
18. Lamm LU, Degos L. Introduction to HLA genetics. In: Dick HM, Kissmeyer-Nielsen F, eds. *Histocompatibility techniques*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979: 131-62.
19. Tiwari JL, Terasaki PI. In: Tiwari JL, Terasaki PI, eds. *Mechanisms of HLA and disease association*. New York: Springer-Verlag, 1985: 28-31.
20. Balendran N, Lough RL, Arguello JR. Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 322-8.
21. Elder JT, Nair RP, Henseler T, Jenish S, Stuart P, Chia N, Christophers E, Voorhees JJ. The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1447-54.
22. Mallon E, Newson R, Bunker CB. HLA-Cw6 and the genetic predisposition to psoriasis: a meta-analysis of published serologic studies. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 693-5.
23. Burden AD. Identifying a gene for psoriasis on chromosome 6 (Psors 1). *Br J Dermatol* 2000; 143: 238-41.
24. Chaonhakarn C, Romphruk A, Puapairoj C, Jirattananapachai K, Romphruk A, Leelayuwat C. Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais. *Intern J Dermatol* 2002; 41: 330-4.
25. Jee SH, Tsai TF, Tsai WL, et al. HLA-DRB1*1401 are associated with genetic susceptibility to psoriasis vulgaris in a Taiwanese population. *Br J Dermatol* 1998; 139: 978-83.
26. Schmitt-Egenolf, Eirmann TH, Boehncke WH, Stander M, Sterry W. Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) Class I side of the extended haplotype CW6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303. A population and family-based study. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 711-4.
27. Hewett D, Samuelsson L, Polding J, Enlund F, Smart D, Cantone K, Gee See C, Chadha S, Inerot A, Enerback C, Montgomery D, Christodolou C, Robinson P, Matthews P, Plumpton M, Dykes C, Wahlstrom J, Swanbeck G, Martinsson T, Roses A, Riley J, Purvis I. Identification of a Psoriasis Susceptibility Candidate Gene by Linkage Disequilibrium Mapping with a Localized Single Nucleotide Polymorphism Map. *Genomics* 2002; 3: 305-7.

REPRINTED FROM:

2nd Congress of the
***Federation of
Immunological
Societies of
Asia-Oceania***



Bangkok (Thailand), January 23-27, 2000

Editors

**STITAYA SIRISINHA
SANSANEE C. CHAIYAROJ
PRAMUAN TAPCHAISRI**



MONDUZZI EDITORE

INTERNATIONAL PROCEEDINGS DIVISION

Early-Onset of Psoriasis in Brazilian Patients: Support for HLA-Class I and Class II Analysis

M.H.S. Kraemer, A.M. Uthida-Tanaka, V.C. Oliveira, A.C. Biral, C.B. Cardoso, R.F. Magalhães and L.A. Magna

Immunogenetics Transplant Laboratory, Clinical Pathology Department and Department of Dermatology, School Medical Science Campinas State University, Campinas, SP, Brazil

Summary

The heritable nature of psoriasis, the recognition that abnormal immunological responses are involved in the cause of the disease and epidemiological evidence led to investigations designed to determine whether the HLA locus of the MHC is involved in the genetic of psoriasis. 55 unrelated patients with psoriasis, with a mean age of 40 years, and 313 healthy controls were typed and we determined the genotypes of the patients studied. Test for HLA associations with the psoriasis phenotype were performed by comparison of the HLA phenotypes of the individual with those of the unrelated local controls by use of 2X2 contingency tables. The frequencies of HLA-A1 – A2 – B13 – B35 – B57 – CW6-CW7 and HLA-DR7-DQ5 were increased in the patient group, $p < 0,001$. The high frequency of these molecules among patients with age at onset of 21 or younger suggest that this finding may facilitate the identification of individuals genetically determined, in which, the presence of this markers is associated with the characteristics of early onset or recurrence of the disease.

Introduction

Psoriasis (Ps) is a common, clinically well-characterised inflamma-

tory, hiperproliferative skin disease, that result partly from chronic dysregulation of the immune system (Breathnach, 1993). There is increasing evidence that immune system activation plays a central role and requires presentation of an antigen by major histocompatibility complex (MHC) class II-positive antigen-presenting cells to CD4⁺ T cells in the epidermis and the keratinocyte hiperproliferation for the initiation of the disease (Griffiths & Voorhees, 1996). Studies with identical twins suggest that simple inheritance of the requisite genetic susceptibility factors is not sufficient for expression of the disease. Environmental factors also play a role: stress, bacterial infections also contributing to the development of the disease (Brandrup et al, 1978).

It has been shown that genetic factors are implicated in its etiology (Elder et al, 1994) with special human leukocyte antigens (HLA) and a familial segregation, showing early-onset (Henzeler & Christophers, 1985).

The most consistently reported relative risk has been with HLA-CW6 in many population (Elder et al, 1994) and HLA-CW6 shows the most pronounced increased despite racial and ethnic differences (Tiilikainen et al, 1980). Other HLA antigens that are known to be expressed in strong association with psoriasis included the class I -HLA-A1, HLA-A2, HLA-B13, HLA-B17, HLA-B57 and the class II - HLA-DR7 antigen (Henzeler et al, 1992).

A strong association of early-onset psoriasis and expression of the HLA-class I and class II were observed among patients who tested positive for certain HLA antigens. These studies have shown that HLA-A2, B13, CW6, CW7, DR7 is present in 80,4% - 85,3% of patients with early-onset psoriasis.

In this context we investigated HLA class I and class II alleles in 55 Brazilian unrelated patients and 343 for class I and 242 for class II individuals controls. The p value obtained using the two-tailed Fischer exact test was corrected (pc) according to the number of antigens tested and comparison made.

Material and Methods

Fifty-five unrelated Brazilian Ps patients seen at the Unicamp - University Hospital in Campinas, São Paulo, Brazil were examined. The patients group consisted of 30 males and 25 females. 343 for HLA class II healthy Brazilian individuals served as controls. After obtaining informed consent, venous blood was drawn from each individual.

HLA typing

Lymphocytes were obtained from heparinized whole blood by Ficoll-Hypaque density gradient separation. HLA class I (HLA-A,B,C) and

class II (HLA-DR-DQ) typing was performed by conventional serology, using anti-HLA sera screened in our laboratory as well as antisera provided by the Institute de Recherches sur les Maladies du Sang, University of Paris, and the Department of Immunology, EPM, São Paulo, Brazil, together with commercially available antisera. Typing was performed by a complement-mediated microlymphocytotoxicity assay on peripheral blood mononuclear cells using purified T cells to detect class I antigens, and purified B-cells for class II antigens. B cells were isolated on a nylon wool column as previously described. Cell viability was assessed by Trypan blue dye exclusion.

Table 1. Frequency (%) of HLA-A, -B and -CW antigen in patients with Psoriasis (PsV) and Control (c)

HLA-A	PsV	C	HLA-B	PsV	c	HLA-CW	PsV	C
A1	14(25.4)	19(5.5)	B7	5(9.0)	14(25.4)	CW1	7(12.7)	20(5.8)
A2	32(58.1)	49(14.2)	B8	3(5.4)	10(18.1)	CW2	4(7.2)	8(2.3)
A3	6(10.9)	16(4.6)	B13	8(14.5)	5(1.4)	CW3	5(9.0)	22(6.4)
A9	0(0.0)	5(1.4)	B14	6(10.9)	8(2.3)	CW4	14(25.4)	23(6.7)
A10	0(0.0)	4(1.1)	B15	2(3.6)	4(1.1)	CW5	1(1.8)	18(5.2)
A11	1(1.8)	8(2.3)	B16	0(0.0)	2(0.5)	CW6	22(40.0)	20(5.8)
A19	2(3.6)	7(2.0)	B17	4(7.2)	7(2.0)	CW7	19(34.5)	35(10.2)
A23	4(7.2)	6(1.7)	B18	3(5.4)	10(18.1)	CW8	2(3.6)	7(2.0)
A24	8(14.5)	18(5.2)	B21	0(0.0)	2(0.5)			
A25	1(1.8)	5(1.4)	B22	0(0.0)	1(0.2)			
A26	0(0.0)	3(0.8)	B27	4(7.2)	4(1.1)			
A28	1(1.8)	16(4.6)	B35	12(21.8)	19(5.5)			
A29	3(5.4)	8(2.3)	B37	4(7.2)	3(0.8)			
A30	5(9.0)	4(1.1)	B38	3(5.4)	3(0.8)			
A31	2(3.6)	1(0.2)	B39	4(7.2)	5(1.4)			
A32	2(3.6)	2(0.5)	B40	0(0.0)	3(0.8)			
A33	3(5.4)	3(0.8)	B41	0(0.0)	2(0.5)			
A34	2(3.6)	1(0.2)	B42	0(0.0)	1(0.2)			
A36	0(0.0)	1(0.2)	B44	5(9.0)	23(6.7)			
A66	0(0.0)	0(0.0)	B45	1(1.8)	2(0.5)			
A68	0(0.0)	1(0.2)	B47	0(0.0)	1(0.2)			
A69	0(0.0)	1(0.2)	B48	0(0.0)	0(0.0)			
A74	0(0.0)	0(0.0)	B49	2(3.6)	6(1.7)			
			B50	4(7.2)	1(0.2)			
			B51	9(16.3)	24(6.9)			
			B52	2(3.6)	1(0.2)			
			B53	0(0.0)	2(0.8)			
			B54	0(0.0)	1(0.2)			
			B55	0(0.0)	1(0.2)			
			B56	0(6.0)	1.02			
			B57	8(14.5)	4(1.1)			
			B58	1(1.8)	2(0.8)			
			B60	1(1.8)	6(1.7)			
			B61	0(0.0)	1(0.2)			
			B62	3(5.4)	5(1.4)			
			B63	0(0.0)	1(0.2)			
			B73	0(0.0)	0(0.0)			

Table 2. Frequency (%) of HLA-DR and DQ antigens in patients with Psoriasis (PsV) and controls (c)

HLA-DR	PsV	c	HLA-DQ	PsV	c
DR1	7 (12.7)	25(10.3)	DQ1	18(32.7)	59(24.3)
DR2	6(10.9)	23(9.5)	DQ2	8(14.5)	16(6.6)
DR3	2(3.6)	22(9.0)	DQ3	8(14.5)	42(17.3)
DR4	3(5.4)	33(13.6)	DQ4	0(0.0)	2(0.8)
DR5	0(0.0)	3(1.2)	DQ5	9(16.3)	4(1.6)
DR6	0(0.0)	2(0.8)	DQ7	12(21.8)	32(13.2)
DR7	16(29.0)	16(6.6)	DQ8	0(0.0)	1(0.4)
DR8	0(0.0)	4(1.6)			
DR9	1(1.8)	4(1.6)			
DR10	3(5.4)	2(0.8)			
DR11	7(12.7)	22(9.0)			
DR12	0(0.0)	1(0.4)			
DR13	4(7.2)	7(2.8)			
DR14	0(0.0)	4(1.6)			
DR15	4(7.2)	1(0.4)			
DR16	1(1.8)	0(0.0)			
DR17	1(1.8)	0(0.0)			
DR52	17(30.9)	74(30.5)			
DR53	19(34.5)	51(21.0)			

Results and Discussion

The frequency of HLA-A, -B, -CW, -DR and DQ antigens observed in patients and control individual is shown in tables 1 and 2.

Regarding the comparisons of HLA frequency between patients and controls, HLA-A1 and HLA-A2 were present in 25.4% ($p < 0.001$) and 58.1% ($p < 0.001$) of patients with psoriasis, respectively compared with 5.5% and 14.2% of members of the control group, respectively. The frequency of HLA-B13 : 14.5% in patients, 1.4 in controls ($p < 0.001$); HLA-B57, in patients, 15.8% in controls; 1.1% ($p < 0.001$).

Regarding the comparisons of HLA frequency between patients and controls, HLA-CW6 and HLA-CW7, HLA-DR7 and HLA-DQ5 antigens were significantly increased. They were present in 25.4% and 58.1%, 40.0% and 34.5% of patients respectively compared with 5.5%; 14.2%, 5.8% and 10.2% of members of the control group, respectively.

The observation of increased frequency of HLA-A1 – A2 – B13 – B35 – B57 – DR7 and DQ5 in patients compared to controls suggest a familial segregation. The presence of a disease gene in the HLA region has long been suspected, on the basis of the HLA-association studies (reviewed in Elder et al, 1994). However, the precise genetic basis of HLA association in psoriasis has remained elusive, as it has in other autoimmune disorders.

This study also suggests a linkage between psoriasis and HLA. Thus,

there is a locus contributing to psoriasis susceptibility, located in the HLA region on chromosome 6p. Moreover, HLA locus or that the different types are due to primary genes on other locations and that HLA antigens only influence the age at onset is not yet known.

Our material present a significant peak for the HLA antigens at an age at onset of 21 years or younger. The difference in frequency of HLA antigens significantly increased only of the patients had an age at onset lower than 22 years, indicating an overrepresentation of young ages, and the difference in frequency among healthy controls illustrates this fact.

In summary this study revealed the positive association of the HLA-A1, A2, B13, B35, B57, DR7 and DQ5 and the early onset of psoriasis.

Further molecular studies and studying psoriatic families may elucidate these genes and may discriminate this specificity to improve the understanding of such associations.

References

1. Elder JT, Nair RP, Guo SW, Henseler T, Christophers E, Voorhees JJ. The genetic of psoriasis. *Arch Dermatol*, 130:216-224, 1994.
2. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M. Psoriasis and HLA-CW6. *Br J Dermatol*, 102:179, 1980.
3. Griffiths CEM, Voorhees JJ. Psoriasis T cells and autoimmunity. *J R Soc Med*, 89:315-319, 1996.
4. Breahnach SM. The skin immune system and psoriasis. *Clin Exp Immunol*, 91:343-435, 1993.
5. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterisation of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 13:450-456, 1985.
6. Brandrup F, Hauge M, Hemmingsen K, Ericksen B. Psoriasis in an unselected series of twins. *Arch Dermatol*, 114:874-879, 1978.
7. Henseler T, Koch F, Westphal E. Presence of HLA-DR7 in type I Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 98:607-621, 1992.
8. Brenner W, Gschnait F, Mayr WR. HLA B13, B17, B37, and CW6 in psoriasis vulgaris: association with the age of onset. *Arch Dermatol Res*, 262:337-339, 1978.
9. Henseler T. The genetics of Psoriasis. *Am J Dermatol*, 37:51-511, 1997.



15th Immunogenetics and Histocompatibility Workshop and Conference

13-20 September, 2008
Buzios - Rio de Janeiro - Brazil

Dear Author

On behalf of the 15th IHIWS Abstract Review and Mini-Symposia Committees, we are pleased to inform you that your abstract entitled "**ANALYSIS OF SINGLE-LOCUS AND MULTILOCUS HAPLOTYPE SEGREGATION AND LINKAGE IN FAMILIAL PSORIASIS**", by Ana Cristina Biral, Renata F Magalhaes, Celso T Mendes-Junior, Eduardo A Donadi, Maria Helena S Kraemer, has been accepted for **poster presentation** in the Histocompatibility and Immunogenetics Conference in Rio de Janeiro, RJ. Congratulations!

Later on you will receive more information regarding your presentation.

Register for the 15IHIWS on-line at www.15ihiws.org. We encourage you to register before June 15 in order to benefit from the lowest registration fee. Remember that only abstracts from authors that are registered for the Conference by July 15 will be printed in the journal "Tissue Antigens".

We are looking forward to welcoming you in Brazil.

The 15IHIWS Organization Secretariat

Please select Print from the file menu to print your Abstract.

ASHI 34th Annual Meeting

Abstract Number: 850236

Presenting Author: Maria Helena S Kraemer, Prof. Dr.

Author for Correspondence: Renata F Magalhaes, Dr

Department/Institution: Dermatology, University of Campinas

Address: R. Tessalia Vieira Camargo St. 126

City/State/Zip/Country: Campinas, Sao Paulo, 13083-970, Brazil

Phone: 55-19-35217602 **Fax:** 55-19-35217169 **E-mail:** renatafmagalhaes@uol.com.br

Abstract Categories:

Category 1: 4. Genetic Polymorphism (MHC/MIC/KIR/Cytokines)

Category 2: 8. HLA Typing/Anthropology/Disease Association

Presentation Type: Poster Presentation

Awards:

The International Scholar Award: Yes

The ASHI Scholar Award: Yes

The Case Study Award: No

Authorization:

Reproduction and publication of my abstract by ASHI in Human Immunology: Yes

DISCLOSURES WERE SUBMITTED ON BEHALF OF AUTHOR(S) BY:

First Name: Renata

Last Name: Magalhaes

Date: June 1, 2008

Phone Number 55-19-35217602

AUTHOR DISCLOSURES:

Name of Author: Renata Magalhaes

Declaration: Signed

Name of Author: Ana Biral

Declaration: Signed

Name of Author: João Pancoto

Declaration: Signed

Name of Author: Eduardo Donadi

Declaration: Signed

Name of Author: Maria Helena Kraemer

Declaration: Signed

Title: POLYMORPHISMS IN THE TNF-238 AND -308 PROMOTER REGION IN BRAZILIAN PATIENTS WITH EARLY-ONSET PSORIASIS

Magalhaes, Renata F¹; Biral, Ana C²; Pancoto, João A³; Donadi, Eduardo A³ and Kraemer, Maria Helena S². ¹Dermatology, Faculty of Medical Science, Campinas, Sao Paulo, Brazil, 13083-970; ²Immunogenetic Transplant Laboratory, Department of Clinical Pathology; Faculty of Medical Science, University of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil, 13083-970 and ³Immunogenetic Laboratory, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, 13083-970.

Aim: Psoriasis is a chronic inflammatory dermatosis around 2.5% of the Brazilian population. Polymorphisms in the TNF promoter region, especially replacement of guanine with adenine in positions -238 and -308, are related to different genotypes. There is higher TNF production and higher genetic risk in Caucasoid populations, not found in Japanese populations. This study was to evaluate whether polymorphisms in the TNF promoter region are genetic risk factors for the occurrence of psoriasis.

Methods: Fifty-one patients who had disease onset up to 18 years of age and 50 controls were studied. The TNF promoter genes polymorphism was assessed by DNA/PCR/SSP, concerning the presence of single nucleotide polymorphism (SNP) -308A/G and -238A/G. Overall allele frequencies were estimated by Fisher test.

Results: In the TNF-238 position were found, in patients and controls, GG genotype in 35 (70.0%) and 37 (72.6%), GA in 15 (30%) and 14 (27.4%) respectively, and AA in none of the cases. In the TNFA-308 position, the GG genotype was found in 43 patients (86%) and 49 controls (96%), the GA genotype in 7 (15,7%) patients and 2 (4%) controls and AA in none of the cases. No statistical difference was observed between the patient and the control groups in this study.

Conclusions: These data suggest that polymorphism of the TNF promoter region, in brazilian patients with early onset psoriasis, would not be the psoriasis genetic risk factor, and encourages future investigations.

Close Window



Volume 68, Supplement 1

ISSN 0198-8859

Supplement to

Human Immunology

The American Society for
Histocompatibility and Immunogenetics

33rd Annual Meeting Abstracts

October 8–12, 2007

Hyatt Regency
Minneapolis, Minnesota

Immunogenetics, Clinical and Experimental Immunology

Editor-in-Chief:
N. Suciu-Foca
New York, USA



161-P

PROBING HLA B27/ANKYLOSING SPONDYLITIS IN UAE PATIENTS. Haider M. Al Aitia,¹ Anitha Santhosh,² Iman Hussein,¹ Laila O. Abdel-Wareth,³ Maha I. Mustafa,³ Olanpayongan Gumama,² Marion S. Alvares.² ¹Internal Medicine and Rheumatology, Mafraq Hospital, Abu Dhabi, United Arab Emirates; ²Immunology and Specialized Testing, Laboratory Medicine Department, Mafraq Hospital, Abu Dhabi, United Arab Emirates; ³Laboratory Medicine Department, Sheikh Khalifa Medical City, Abu Dhabi, United Arab Emirates.

Objectives: The present study aims to identify HLA B27 frequencies in a cohort of patients referred with a diagnosis of HLA B27- related disorders.

Subjects and Methods: A total of 257 samples of unrelated patients were tested for HLA B27 over a period of five years. Of these, 153 (59.5%) had a clear diagnosis at the time of referral. The patients were grouped as UAE Arabs (Emiratis; n=57), Expatriate Arabs (other Arabs; n=53), and Asians (n=43). Microlymphocytotoxicity / Low resolution PCR-SSP methods were used for HLA B27 typing. Statistical analysis was performed by Fisher's exact test.

Results: HLA B27 was positive in only 4/57 (7%) Emiratis as compared to 13/53 (24%) p=0.016 in other Arabs and 11/43 (25.5%) p=0.006 in Asians.

There were 22 patients diagnosed with ankylosing spondylitis (AS). In those, 11 (50%) were HLA B27 positive. The B27 AS cases were 0/4 (0%) in Emiratis, 6/9 (66.5%) in other Arabs and 5/9 (55.5%) in Asians. Therefore, the 50% positivity is purely attributed to the non-UAE AS patients. The Emirati patients with positive HLA B27 were diagnosed as monoarthritis, uveitis, reactive arthritis and sacroiliitis.

Conclusions: Our results suggest that the prevalence of HLA B27 positive patients is significantly low in Emiratis, particularly in relation to ankylosing spondylitis. Therefore, HLA B27 positive AS is anticipated to be present among the exogenous population of patients.

162-P

HUMAN MHC GENE POLYMORPHISM IN RELATION TO BULLOUS PEMPHIGOID AND PSORIASIS VULGARIS. Renata F. Magalhaes,² Ana Cristina Biral,¹ Igor H. Morita,² Maria Leticia Cintra,³ Elemir M. Souza,² Maria Helena S. Kraemer.¹ ¹Immunogenetic Transplant Laboratory, Clinical Pathology, School of Medical Science, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ²Dermatology, School of Medical Science, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ³Pathological Anatomy, School of Medical Science, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Classical MHC is densely packed with immunologically important genes and it is known to harbor major genetic determinants for autoimmune diseases. Thus, autoimmune diseases such as Bullous pemphigoid (BP) and psoriasis vulgaris (PV), which in the patients who were the subjects of this study happened concomitantly and in rare association, were investigated regarding polymorphism of HLA class I and II alleles by means of DNA/PCR/SSP. A lesion histopathologic exam was also carried out through HE staining. Biopsies revealed, under immunofluorescence, a subepidermal blister with IgG deposit in the basal membrane zone, confirming the BP diagnosis. There are descriptions of BP in PV patients where the blisters appear on the psoriatic lesions or in independent places. In some cases, the therapy used for PV might be the cause. The alleles of the ancestral haplotype (AH) 8.1, which has been called "autoimmune haplotype", were identified in one of the patients. The HLA alleles, more frequently associated with BP and PV, vary according to the geographic area and ethnic group. Our investigation identified in patients with a rare association of PV with BP flare-up, haplotypes constituted of HLA markers that may assist in the discernment of the pathogenesis and influence the choice of therapy for prevention and treatment of these diseases.



ISSN 0198-8859

Supplement to

Human Immunology

32nd Annual
ASHI Meeting
Abstracts 2006
Volume 67
Supplement 1

The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics

32nd Annual Meeting Abstracts

October 16–20, 2006

Sheraton Hotel and Marina
San Diego, California

Meeting Attendees: This is the Only Copy of the Abstracts You Will Receive

The Official Journal of

ASHI

AMERICAN SOCIETY FOR
HISTOCOMPATIBILITY &
IMMUNOGENETICS



183-P

ASSOCIATION BETWEEN HEPATITIS C VIRUS CHRONIC INFECTION AND HLA-DRB1 AND HLA-DQB1 ALLELES Erika F. Campos,¹ L.O. Cangussu,² Gisele Rampim,¹ R. Cabral,² L. Silva,² Rosângela Teixeira,² M. Gerbase-DeLima.¹ ¹Immunogenetics, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ²Viral Hepatitis Division, Clinical Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Aim: The aim of this study was to investigate association between hepatitis C virus (HCV) infection and HLA-DRB1 and DQB1 alleles. Considering reports from the literature, our hypothesis (H1) was that HLA-DRB1*1101, DRB1*1104 and DQB1*0301 confer resistance to HCV infection.

Methods: Ninety-nine Brazilian Caucasian individuals with chronic HCV infection were included in the study: 48 males, 51 females; average age: 51.5 ± 12 years; average age at the diagnosis of HCV infection: 26.1 ± 11 years. Cirrhosis (F3-F4 METAVIR) was present in 50 patients and the length of disease did not differ between patients with and without cirrhosis (means of 23.8 and 20.5 years, respectively). HLA-DRB1 specificities (DRB1*1-16) and DRB1*11 and DQB1* alleles were determined by PCR-SSP (One Lambda). The frequencies observed in the patients were compared to those from a sample of 103 Brazilian Caucasian individuals from the general population (two-sided Fisher's test, except for the comparison of HLA-DRB1*11, DRB1*1101, DRB1*1104 and DQB1*0301 frequencies for which one-sided test was used).

Scope: Phenotypic frequencies of HLA-DRB1*11 were 11.1% and 21.4% in patients and healthy controls, respectively (p=0.037; OR: 0.46) and no difference of this frequency was observed between patients with (10.0%) and without (12.2%) cirrhosis. Other HLA-DRB1 specificities frequencies did not differ between patients and controls. Concerning DRB1*11 alleles, lower frequencies of DRB1*1101 (7.1 vs 12.6%) and *1104 (4.0 vs 7.8%) alleles were observed in the patients, although the differences did not reach statistic significance. A higher frequency of DQB1*0501 was observed in patients (34.4 vs 20.4%, two sided p=0.04).

Conclusions: In conclusion, our results are in line with data from the literature concerning HCV infection protection conferred by DRB1*11 (DRB1*1101 and *1104 alleles). The possible susceptibility to HCV infection conferred by DQB1*0501 observed in this study deserves confirmation.

184-P

LINKAGE ANALYSIS IN FAMILIAL PSORIASIS: IDENTIFICATION OF DISEASE ASSOCIATED MHC ALLELES AND HAPLOTYPES IN BRAZILIAN PATIENTS Ana Cristina Westphal Cheraria Biral, Renata F. Magalhães, Celso T. Mendes-Junior, Eduardo A. Donadi, Maria Helena Stangler Kraemer. Clinical Pathology, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil; Dermatology, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil; Medical Clinical, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Aim: Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease and although it is strongly associated with alleles from the major histocompatibility complex (MHC), the pathogenetic nature of these associations remains elusive. The objectives of this study were to identify the linkage of psoriasis to HLA markers in families and compare the major risk alleles/haplotype in these families with those determined by previous case-control studies in Brazilian patients.

Methods: HLA class I alleles were identified by DNA/PCR/SSP in 9 families comprising 52 subjects. Single-locus and multi-locus haplotype associations with psoriasis were evaluated by the transmission disequilibrium test (TDT).

Scope: Results were observed in the transmission of eleven alleles and two haplotypes from affected parents to affected offspring, which deviates from random segregation, whereas no more than three alleles and two haplotypes deviate from random segregation in the two control situations (affected offspring and all offspring) in which the offspring of unaffected parents are considered. In addition, the transmission of HLA-C alleles departs from random expectations. HLA-A*03, A*26, B*35, B*57, Cw*04, Cw*06 alleles and A*03, B*57, Cw*06 haplotype of the thirteen alleles/haplotypes transmitted from affected parents to affected offspring that deviate from random segregation are overrepresented in the affected offspring when compared with unaffected sibs.

Conclusions: HLA-B*57, Cw*06 and Cw*12 alleles, as well as the A*03, B*57, Cw*06 haplotype found in this family-based study corroborate previous conclusions obtained by our research group in a case-control study design. However, the analysis of new families may elucidate which of these alleles actually show a strong association with the studied disease.



ISSN 0198-8859

Supplement to

Human Immunology

31st Annual
ASHI Meeting
Abstracts 2005
Volume 66,
Supplement 1

The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics

31st Annual Meeting Abstracts

October 17-21, 2005

Washington Hilton and Towers
Washington, DC

Meeting Attendees: This is the Only Copy of the Abstracts You Will Receive

The Official Journal of

ASHI
AMERICAN SOCIETY FOR
HISTOCOMPATIBILITY &
IMMUNOGENETICS



4
73-P

GENETIC SUSCEPTIBILITY FACTORS IN MHC ASSOCIATED WITH PSORIASIS VULGARIS: A STUDY OF BRAZILIAN PATIENTS Ana Cristina C. Biral, Renata F. Magalhaes, Isabela J. Wastowski, Renata Simoes, Eduardo A. Donadi, Aguinaldo L. Simoes, Celso Mendes-Junior, Maria Helena Stangler Kraemer, Department of Clinical Pathology, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil; Department of Dermatology, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil; Department of Genetics, USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil; Department of Medical Clinical, USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease. Only few studies were published that correlate psoriasis vulgaris with both TNF microsatellites and HLA. We therefore investigated the genetic association of polymorphism of both microsatellites (TNF α -e) and HLA Class I with onset of psoriasis vulgaris in Brazilian patients. The genomic DNA was extracted from the blood samples of 92 patients with psoriasis and 160 controls using the salting-out method. HLA class I alleles and microsatellites were identified by DNA amplification, hybridized with specific primer sequences and revealed by agarose and polyacrylamide gels, respectively. HLA-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06, HLA-B*39 Cw*12 and the extended haplotype HLA-B*57 Cw*06/TNF α 2b5c2d4e3 were found to be increased in patients with psoriasis type I when compared to controls ($p < 0.05$). TNF α 2b1c2d4e1 haplotype showed a decreased frequency ($p < 0.05$) in psoriasis patients (onset of disease not considered) compared to controls. HLA-B*13 allele and HLA-B*13 Cw*06, TNF α 11b4c1d3e3 haplotypes showed increased frequencies ($p < 0.05$) in patients with type II psoriasis compared to controls. We identified risk and protection towards disease that were related to haplotypes constituted by HLA and TNF STR markers in Brazilian patients with psoriasis vulgaris, but the influence of those haplotypes on the pathogenesis of the disease remains unknown.

4
74-P

FREQUENCY OF HLA-DRB1*15 HAPLOTYPES LACKING EXPRESSED DRB5* GENE PRODUCTS Heather Schatz, Paul R. Kawczak, Dawn M. Thomas, Alan R. Smerglia, David Kahle, Derek Good, Maureen Carr, Daniel J. Cook, Edward J. Ball, Allogen Laboratories, The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA

Among DRB1*15 haplotypes, both DRB5* null alleles and haplotypes lacking a DRB5* gene ("DRB5*Blank") have been described. Here we summarize our local observation of these haplotypes. Among a large number of DRB1*1501 individuals we have observed only 3 cases in which a DRB5* gene was absent. Among 84 DRB1*1502 individuals, 7 (8%) were DRB5*0108N and 3 (4%) were DRB5*0110N, while the majority were DRB5*0101 (31%) or DRB5*0202 (50%). All three DRB5*0110N individuals were HLA-B52 and DQB1*0503. All of the DRB5*0108N individuals were DQB1*0501. In an earlier study we found 8 of 116 (6.9%) African American DRB1*1503 individuals were "DRB5* Blank". We have now observed 26 such individuals with 11/26 (42%) being HLA-B49 and 17/26 being DPB1*1801. Two DRB1*1503, DRB5* Blank individuals transplanted with DR51-mismatched donors who developed anti-DR51 antibodies have been observed. These results indicate that a significant proportion of HLA-DRB1*1502 and DRB1*1503 individuals fail to express a DR51 molecule due to the presence of a null allele or the absence of a DRB5* gene. These haplotypes should be considered in histocompatibility testing.



ISSN 0198-8859

Supplement to

Human Immunology

31st Annual
ASHI Meeting
Abstracts 2005
Volume 66,
Supplement 1

The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics

31st Annual Meeting Abstracts

October 17-21, 2005

Washington Hilton and Towers
Washington, DC

Meeting Attendees: This is the Only Copy of the Abstracts You Will Receive

The Official Journal of

ASHI

AMERICAN SOCIETY FOR
HISTOCOMPATIBILITY &
IMMUNOGENETICS



4
73-P

GENETIC SUSCEPTIBILITY FACTORS IN MHC ASSOCIATED WITH PSORIASIS VULGARIS: A STUDY OF BRAZILIAN PATIENTS Ana Cristina C. Biral, Renata F. Magalhaes, Isabela J. Wastowski, Renata Simoes, Eduardo A. Donadi, Aguinaldo L. Simoes, Celso Mendes-Junior, Maria Helena Stangler Kraemer, Department of Clinical Pathology, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil; Department of Dermatology, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil; Department of Genetics, USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil; Department of Medical Clinical, USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease. Only few studies were published that correlate psoriasis vulgaris with both TNF microsatellites and HLA. We therefore investigated the genetic association of polymorphism of both microsatellites (TNF α -e) and HLA Class I with onset of psoriasis vulgaris in Brazilian patients. The genomic DNA was extracted from the blood samples of 92 patients with psoriasis and 160 controls using the salting-out method. HLA class I alleles and microsatellites were identified by DNA amplification, hybridized with specific primer sequences and revealed by agarose and polyacrylamide gels, respectively. HLA-B*13 Cw*06, HLA-B*57 Cw*06, HLA-B*39 Cw*12 and the extended haplotype HLA-B*57 Cw*06/TNF α 2b5c2d4e3 were found to be increased in patients with psoriasis type I when compared to controls ($p < 0.05$). TNF α 2b1c2d4e1 haplotype showed a decreased frequency ($p < 0.05$) in psoriasis patients (onset of disease not considered) compared to controls. HLA-B*13 allele and HLA-B*13 Cw*06, TNF α 1b4c1d3e3 haplotypes showed increased frequencies ($p < 0.05$) in patients with type II psoriasis compared to controls. We identified risk and protection towards disease that were related to haplotypes constituted by HLA and TNF STR markers in Brazilian patients with psoriasis vulgaris, but the influence of those haplotypes on the pathogenesis of the disease remains unknown.

4
74-P

FREQUENCY OF HLA-DRB1*15 HAPLOTYPES LACKING EXPRESSED DRB5* GENE PRODUCTS

Heather Schatz, Paul R. Kawczak, Dawn M. Thomas, Alan R. Smerglia, David Kahle, Derek Good, Maureen Carr, Daniel J. Cook, Edward J. Ball, Allogene Laboratories, The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA

Among DRB1*15 haplotypes, both DRB5* null alleles and haplotypes lacking a DRB5* gene ("DRB5*Blank") have been described. Here we summarize our local observation of these haplotypes. Among a large number of DRB1*1501 individuals we have observed only 3 cases in which a DRB5* gene was absent. Among 84 DRB1*1502 individuals, 7 (8%) were DRB5*0108N and 3 (4%) were DRB5*0110N, while the majority were DRB5*0101 (31%) or DRB5*0202 (50%). All three DRB5*0110N individuals were HLA-B52 and DQB1*0503. All of the DRB5*0108N individuals were DQB1*0501. In an earlier study we found 8 of 116 (6.9%) African American DRB1*1503 individuals were "DRB5* Blank". We have now observed 26 such individuals with 11/26 (42%) being HLA-B49 and 17/26 being DPB1*1801. Two DRB1*1503, DRB5* Blank individuals transplanted with DR51-mismatched donors who developed anti-DR51 antibodies have been observed. These results indicate that a significant proportion of HLA-DRB1*1502 and DRB1*1503 individuals fail to express a DR51 molecule due to the presence of a null allele or the absence of a DRB5* gene. These haplotypes should be considered in histocompatibility testing.

B L A C K W E L L • M U N K S G A A R D

TISSUE ANTIGENS

IMMUNE RESPONSE GENETICS



Abstracts of the 35th Annual Scientific Meeting
of the Australasian Society for Immunology and
14th International HLA & Immunogenetics
Workshop

VOLUME 66
NOVEMBER
2005

Nº
5

337

Examining Antigen Presenting Cells and T Cells in the Tumour MicroenvironmentB. Koloska^{1,2}, B. Robinson², D. Nelson^{1,2}¹ West Australian Biomedical Research Institute, Curtin University, Perth, WA, Australia² Tumour Immunology Group, University of Western Australia, Perth, WA, Australia

The infiltration of immune cells into cancer tissue is vital for the induction of a host anti-tumour immune response. We examined tumour infiltrating APCs (i.e. macrophages, B cells and DCs), T cells (CD4⁺ and CD8⁺ T cells) and tumour-associated blood vessels throughout the progression of a murine lung carcinoma (LLC/OVA-9).

FACS analysis showed that DCs, macrophages and B cells, respectively, represented $14.05 \pm 1.67\%$, $46.06 \pm 1.75\%$ and $2.53 \pm 0.34\%$ of tumour cellularity, whilst CD4⁺ cells and CD8⁺ cells represented $3.74 \pm 0.48\%$ and $3.83 \pm 0.49\%$ of tumour cellularity, respectively. Hence, APCs account for nearly 66% of the total number of cells within a tumour throughout disease progression. Immunohistochemistry indicated that most cell types studied were evenly dispersed throughout the tumour, except for DCs which appeared in dense clusters of 43.78 ± 6.098 DCs per 0.05 mm^2 of tumour. We have found that APCs and T cells travel in tumour-associated blood vessels, and also, more importantly, can be located in the tumour bed itself. On further examination of the tumour milieu, we found DCs connected in a manner consistent with DC networks and also juxtaposed against B cells, CD11b⁺ macrophages and CD8⁺ and CD4⁺ cells.

Since the tumour is the site where APCs initially experience antigen and ultimately the site where effector-mediated tumour cell lysis needs to occur, understanding locally occurring cellular events could be vital in the design of successful immunotherapeutic schedules.

338

Clinical Correlation of Allogeneic Microchimerism after Liver TransplantationM. B. Araújo¹, L. S. Leonardi², M. I. Leonardi², I. F. S. Boin², E. A. Donadi³, M. H. S. Kraemer¹¹ Clinical Pathology, State University of Campinas – UNICAMP – School of Medical Science, Campinas, SP, Brazil² Surgery, State University of Campinas – UNICAMP – School of Medical Science, Campinas, SP, Brazil³ Immunology, State University of São Paulo -USP – Clinical Hospital of the Medical School of, Ribeirão Preto, SP, Brazil

This research investigated the presence of allogeneic microchimerism in transplanted patients, the occurrence of acute cellular rejection and the level of immunosuppression. Microchimerism was analyzed in 50 patients aged between 15 and 65 years, in the period from 10 days to 16 months after liver transplantation, by means of a nested PCR/SSP typing method. The patients

clinically suspected of rejection were submitted to liver biopsy. Microchimerism was demonstrated in 36 (72%) of the 50 patients: of these, only 10 patients (28%) presented rejection and the remaining 26 (72%) did not show any rejection. Among the patients with microchimerism that presented acute cellular rejection, 4 received CYA (mean level 164.9 ng/ml) and 6 received FK506 (mean level 8.6 ng/ml). In the group of patients with microchimerism and absence of acute cellular rejection, 12 patients received CYA (mean level 164.4 ng/ml) and 14 received FK506 (mean level 7.5 ng/ml). In the group without microchimerism, 05 patients received CYA (mean level 234.1 ng/ml) and 09 received FK506 (mean level 12 ng/ml) after transplantation. The immunosuppressive regime was very similar when microchimerism patients were compared, whether presenting or not acute cellular rejection. The immunosuppressive level was considerably lower in microchimeric patients, when compared to others without microchimerism. In conclusion, our data indicate a predictive value of microchimerism and future protocols based on this study may contribute to the evaluation of this phenomenon in the acceptance of transplanted organs without the use of immunosuppression.

339

Ungueal Psoriasis in Childhood: Evolution to Psoriatic Arthritis and Association with HLA Class I AllelesR. F. Magalhaes², A. C. W. Biral¹, M. H. S. Kraemer¹¹ Clinical Pathology, State University of Campinas-UNICAMP-School of Medical Science, Campinas, SP, Brazil² Medical Clinic, State University of Campinas-UNICAMP-School of Medical Science, Campinas, SP, Brazil

Immunogenetic markers are important in the diagnostic of some diseases, such as spondyloarthropathies; but in psoriasis, which is clinically diagnosed, we still seek a practical application for these markers. This study had the objective of carrying out clinical evaluation and 10-year follow-up of ungueal psoriasis patients with onset before the age of 18, evaluating the HLA phenotype and associating it with disease evolution, since there is association between ungueal psoriasis and development of articular disease. Eighteen patients younger than 18 years of age, with ungueal psoriasis, assisted at the outpatient Dermatology clinic, were studied between 1995 and 2005. The control group was composed of 160 healthy patients who were blood bank donors. Blood was collected and typing of HLA class I alleles was done by DNA/PCR/SSP molecular method. The results obtained for determination of allelic and genic frequencies were submitted to direct counting and, for comparison of patients and controls, the Chi-square and Fisher's exact tests were used. The statistically significant HLA alleles in this group of patients were: HLA-B*13 ($p < 0.003$ and RR 31.80), HLA-B*37 ($p < 0.007$ and RR = 15.80), HLA-B*39 ($p < 0.04$ and RR = 3.87), HLA-Cw*6 ($p < 0.00002$ and RR 11.25) and HLA-Cw*12 ($p < 0.0006$ and RR = 7.20). These alleles were similar to those found in the group of

B L A C K W E L L • M U N K S G A A R D

TISSUE ANTIGENS

IMMUNE RESPONSE GENETICS



Abstracts of the 35th Annual Scientific Meeting
of the Australasian Society for Immunology and
14th International HLA & Immunogenetics
Workshop

VOLUME 66
NOVEMBER
2005

NO
5

patients with psoriasis vulgaris of early onset and, in this observation period, two cases evolved with juvenile psoriatic arthritis, both were HLA-B*27 positive. The knowledge of the HLA phenotype of the patient may contribute to the prediction of clinical and evolutive possibilities of psoriasis. Despite the small number of samples as a consequence of the difficulty in finding unequal disease cases in childhood and following the patients for a long time, the reason for this presentation is to emphasize the importance of seeking practical utilization for the study of HLA in psoriasis.

340

Psoriasis in Childhood Versus Psoriasis in Adolescence – Differences in the HLA Class I Alleles

R. F. Magalhaes², A. C. W. Biral¹, M. H. S. Kraemer¹

¹ Clinical Pathology, State University of Campinas-UNICAMP-School of Medical Science, Campinas, SP, Brazil

² Medical Clinic, State University of Campinas-UNICAMP-School of Medical Science, Campinas, SP, Brazil

Two types of psoriasis are described: one of early onset, strongly associated with immunogenetic markers (85%) such as Cw6, B13, B17 and B37; and another of late onset. As a group of children presents wide clinical variability, would the associated HLA alleles be the same for a group of patients that had the onset of disease at 2 or at 18 years of age? This study had the objective of conducting a clinical investigation of psoriasis carriers with onset of disease prior to the age of 18, evaluate the HLA phenotype and associate it to the age group of onset of disease, classified as childhood or adolescence. Patients with psoriasis were investigated between 1995 and 2005. The control group was composed of 160 healthy patients. Typing of HLA class I alleles was done by DNA/PCR/SSP molecular method. The results obtained for determination of allelic and genic frequencies were submitted to direct counting and, for comparison of patients and controls, the Chi-square and Fisher's exact tests were used. A group of 14 patients began to present the clinical picture of psoriasis between 2 and 10 years of age. The most prevalent alleles, statistically significant in this group, were HLA-B*37 ($p < 0.03$ and $RR = 13.17$), HLA-B*39 ($p < 0.004$ and $RR = 13.17$), HLA-B*55 ($p < 0.03$ and $RR = 13.17$), HLA-Cw*6 ($p < 0.0005$ and $RR = 9.00$) and HLA-Cw*12 ($p < 0.0001$ and $RR = 16.20$). Another group of 14 patients with onset of the disease between 10 and 18 years of age presented positiveness for HLA-B*13 ($p < 0.0016$ and $RR = 43.36$) and HLA-Cw*6 ($p < 0.0005$ and $RR = 9.00$), but no case of HLA-Cw*12. It may be observed that the HLA-Cw*12 is more prevalent in the age groups with earlier onset of the disease. The importance of this study model, despite the small number of samples, resides in the search for clinical applications for the study of the HLA alleles.

341

Psoriasis in Childhood with Total Remission versus Chronic Evolutive Disease: Is Evolution Related to HLA Class I?

R. F. Magalhaes², A. C. W. Biral¹, M. H. S. Kraemer¹

¹ Pathological Clinic, State University of Campinas-UNICAMP-School of Medical Science, Campinas, SP, Brazil

² Medical Clinic, State University of Campinas-UNICAMP-School of Medical Science, Campinas, SP, Brazil

Psoriasis is a chronic inflammatory disease that affects 2% of the global population; it is of multifactorial inheritance, related to the Major Histocompatibility Complex (HLA). The course of disease is uncertain, with cases of total remission after a single crisis and others that become chronic and severe. The objectives of this study were: carry out clinical evaluation and 10-year follow-up of psoriasis patients with childhood onset, evaluate the HLA phenotype and associate it to the course of disease along this period. Thirty-one patients were studied between 1995 and 2005. The control group was composed of 160 healthy patients who were blood bank donors. Blood was collected and typing of HLA class I alleles was done by DNA/PCR/SSP molecular method. The results obtained for determination of allelic and genic frequencies were submitted to direct counting and, for comparison of patients and controls, the Chi-square and Fisher's exact tests were used. It was observed that 16 of the 31 patients (51.6%) presented complete remission of psoriasis after diagnosis and the first therapeutic approach. The other 15 patients (48.4%) evolved with worsening of lesions to extensive and treatment resistant forms. The alleles HLA-B*13 ($p < 0.02$ and $RR = 22.71$), HLA-B*39 ($p < 0.03$ and $RR = 4.52$), HLA-B*55 ($p < 0.04$ and $RR = 11.29$), HLA-Cw*6 ($p < 0.001$ and $RR = 7.00$) and HLA-Cw*12 ($p < 0.0067$ and $RR = 5.40$) were increased in the patients that progressed with total remission of lesions, when compared to the control group of healthy individuals. When the group that presented total remission is compared with the group that evolved to chronic forms, no significant differences were observed between the HLA alleles. It was concluded, through this preliminary study with a small number of samples, that there is no significant correlation between the HLA alleles and possible progression to severe forms of the disease, which would be useful in the management of these cases.

342

Proinsulin Precedes IGRP in the Hierarchy of Autoantigens in Autoimmune Diabetes

B. Krishnamurthy¹, N. L. Dudek¹, H. E. Thomas¹, A. W.

Purcell², A. M. Lew³, L. C. Harrison³, T. W. H. Kay¹

¹ Diabetes and Immunology, St. Vincent's Institute, Fitzroy, VIC, Australia

² Biochemistry and Molecular Biology, The Bio21 Institute, Parkville, VIC, Australia

³ Autoimmunity and Transplantation Division, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, VIC, Australia

Type 1 diabetes in humans and non-obese diabetic (NOD) mice is characterised by immune responses against several autoantigens expressed in the pancreatic beta cell. In NOD mice, proinsulin and islet specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit related