LÉA CAMPOS DE OLIVEIRA

Estudo do polimorfismo genético na hepatite auto-imune na
infância: busca de genes e haplótipos de suscetibilidade

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Gilda Porta
Co-orientadora: Profa. Dra. Anna Carla Goldberg

SÃO PAULO
2008

Ao meu grande amigo e amado Milton Jacob Bechara “in memorian”, exemplo de dedicação e determinação, onde quer que esteja, com certeza estará feliz com a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay, com quem tido a oportunidade de trabalhar nestes últimos anos, pela oportunidade de eu poder realizar este trabalho. Por todo apoio, exemplo de dedicação e incentivo dados em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil por permitir a realização deste trabalho no Laboratório de Imunologia do InCor e pelo exemplo de pesquisador.

À Profa. Dra. Gilda Porta, minha orientadora, pela oportunidade de trabalhar com uma doença tão intrigante e me colocar neste “mundo” da Biologia Molecular, pela orientação e apoio na execução deste trabalho.

Profa. Dra. Anna Carla Goldberg, minha co-orientadora, pelo ensinamento nessa área tão envolvente que é a imunogenética, por toda ajuda, apoio e orientação.

Ao Dr. Rajendranath Ramasawmy, pelos ensinamentos sobre polimorfismos, pela ajuda nos protocolos e apoio na realização deste trabalho.

À minha doce amiga Malu, uma dessas pessoas que a vida coloca em nosso caminho para nos ajudar a tirar as pedras mais pesadas e a persistir sempre. Obrigada pelo seu exemplo como profissional, pelo seu apoio incondicional e pela amizade que pudemos compartilhar.

À minha querida amiga Liliam, por toda ajuda e orientação na análise estatística, pela amizade e carinho e por todo apoio na realização deste trabalho.

Ao pessoal do LIM-36, Gilda Del Negro, Lídia Yamamoto e Patrícia Pieri, pelo apoio e oportunidade para eu pudesse me ausentar do laboratório para a execução da parte experimental deste trabalho e me darem tranquilidade para realização de todo o trabalho e especial à Érika Manulli pela amizade, carinho e por me ajudar sempre a seguir em frente.

Às pós-graduandas do departamento de Pediatria, minhas queridas pupilas, Karina e minha “filhoca” Mariana por toda compreensão, ajuda e amizade e aos estagiários, Vagner, Fernanda, Roberta e Jerônimo pelo apoio e agradável convívio, apesar de todo estresse.

À amiga Amanda Farage Frade, por toda ajuda na execução da parte experimental de trabalho, por todo seu apoio e carinho.

A todo pessoal do Laboratório do InCor, pelo agradável convívio, apoio e ajuda na realização deste trabalho, especialmente à Selma por sua sensibilidade e amizade, ao sr Jair por toda paciência e disposição para me ajudar na compra de todo material deste trabalho.

Ao pessoal da Nova Flavius, em especial à Silvana e à Amarilda, pelo carinho e por me entenderem a importância desse trabalho na minha carreira.

Em especial, à toda minha família, minha irmã Lis, meus irmãos Luiz Cláudio e Luis Guilherme, minhas adoráveis sobrinhas, Victória e Isadora e em especial, aos meus pais Mário Luiz e Odila, por todo apoio, exemplos de pessoas e de dignidade e pela compreensão da minha ausência para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho.

"Transforme as pedras que você tropeça
nas pedras de sua escada."

Sócrates

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia De A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas/siglas

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Considerações históricas.....	02
1.2. Descrição da doença.....	03
1.3. Quadro clínico e diagnóstico.....	04
1.4. Imunologia do Fígado.....	07
1.5. Auto-imunidade.....	08
1.6. Patogenia da hepatite auto-imune (HAI).....	11
1.7. Polimorfismo genético.....	13
1.7.1. Polimorfismo genético do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH).....	15
1.7.2. Polimorfismo tipo “Single Nucleotide Polymorphism (SNP).....	20
1.8. .Função dos genes presentes entre as classes II e I do CPH.....	21
1.8.1. Genes de resposta imune presentes no CPH estudados.....	22
1.8.2. Genes HLA não clássicos estudados: “MHC class I chain- related gene A” (<i>MICA</i>).....	25
1.8.3. Suscetibilidade genética a doenças auto-imunes.....	26
1.8.4. Suscetibilidade genética à Hepatite Auto-Imune	26

1.9. Citocinas	29
1.9.1. Citocinas envolvidas na produção de IgE: IL -4, IL-5, IL-10 e IL-13.....	30
1.9.2. Genes das interleucinas IL -4, IL-5, IL-10 e IL -13.....	34
2. OBJETIVOS.....	38
3. CASUÍSTICA MÉTODOS.....	40
3.1. Aspectos éticos.....	41
3.2. Critérios de inclusão.....	41
3.3. Casuística.....	42
3.4. Métodos.....	43
3.4.1. Extração de DNA.....	43
3.4.2. Identificação dos polimorfismos (SNPs) das citocinas.....	46
3.4.2.1. PCR-RFLP.....	47
3.4.2.2. PCR-SSP.....	50
3.4.2.3. Tipificação de HLA-B por PCR-SSO.....	51
3.4.2.4. PCR-SSP para o gene MICA.....	55
3.5. Análise Estatística.....	61
4. RESULTADOS.....	65
4.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).....	66
4.2. Estudo dos genes presentes entre as classes I e II do CPH e receptores de TNF.....	66
4.2.1. Análise individual dos SNPs	66
4.2.1.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa (<i>TNFA</i>).....	66
4.2.1.2. Linfotóxina Alfa (<i>LTA</i>).....	67

4.2.1.3. “Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1” (<i>NFKBIL-1</i>)	68
4.2.1.4. “HLA-B Associated Transcript 1” (<i>BAT-1</i>).....	70
4.2.1.5. MHC class I chain-related A (<i>MICA</i>) e <i>HLA-B</i>	70
4.2.1.6. Receptores de <i>TNF</i>	70
4.2.2. Análise dos haplótipos	74
4.2.2.1. Haplótipo estendido do CPH entre as classes II e I.....	74
4.2.2.2. Haplótipos dos SNPs do CPH entre classes II e I.....	75
4.2.3. Correlação com os níveis de IgE.....	76
4.2.3.1. Genes isolados.....	76
4.2.3.2. Haplótipos	77
4.3. Estudo dos polimorfismos nos genes das citocinas envolvidas na produção de IgE presentes no cromossomo 5 e de seus receptores	78
4.3.1. Análise individual dos genes.....	78
4.3.1.1. Interleucina 4 (<i>IL-4</i>).....	78
4.3.1.2. Interleucina 5 (<i>IL-5</i>).....	78
4.3.1.3. Interleucina IL-13 (<i>IL-13</i>).....	80
4.3.1.4. Receptor de IL-4 (<i>IL-4R</i>).....	80
4.3.1.5. Receptor de IL-13 (<i>IL-13R</i>).....	81
4.3.2. Análise dos haplótipos	82
4.3.2.1. Haplótipos contendo os SNPs <i>IL-5-746C/T</i> , <i>IL13110Gln/Arg</i> , <i>IL-4-589</i> , <i>IL-4+33</i>	82
4.3.3. Correlação com níveis de IgE	83

4.3.3.1. Genes isolados.....	83
4.3.3.2. Haplótipos.....	84
4.4. Estudo dos polimorfismos no gene das citocinas envolvidas na produção de IgE presentes no cromossomo 1 e de seus receptores..	84
4.4.1. Análise individual dos SNPs	84
4.4.1.1. Interleucina 10 (<i>IL-10</i>).....	84
4.4.1.2. Receptor de <i>IL-10</i> (<i>IL-10R</i>).....	85
4.4.2. Análise dos haplótipos.....	87
4.4.3. Correlação com níveis de IgE	88
4.4.3.1. Análise individual dos SNPs	88
4.4.3.2. Análise dos haplótipos	89
5. DISCUSSÃO.....	90
6. CONCLUSÕES.....	114
7. ANEXOS.....	116
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

Apêndices

Lista de abreviaturas

BAT1 – do inglês “HLA-B associated transcript 1”

CPH – Complexo Principal de Histocompatibilidade

DNA – do inglês “desoxiribonucleic acid”

dNTP – mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

EDTA – do inglês “Ethylene diamine tetracetic acid”

FR – febre reumática

g/L – gramas por litro

HAI – Hepatite auto-imune

HAI-1 – hepatite tipo 1

HAI-2 – hepatite tipo 2

HLA - do inglês “Human leukocyte antigen”

HLA-B – do inglês “Human leukocyte antigen -B

HLA-DR - do inglês “Human leukocyte antigen -DR

IgE –imunoglobulina E

IL - interleucina

IL-4R - receptor de interleucina 4

IL-10R – receptor de IL10

IL-13Ra(IL13RA) – receptor de interleucina 13 (gene)

kb – kilo base

Kda - kilodalton

LES – Lupus eritematoso sistêmico

LSEC - células endoteliais dos sinusóides hepáticos

LT– gene da linfotoxina alfa

LTa (LTA) – linfotoxina alfa (gene)

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MICA – do inglês " MHC class I chain-related A

mL – mililitro

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

NFκB – do inglês " Nuclear Factor κB"

NF κ BIL1 (NFKBIL1) – do inglês "Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1" (gene)

ng – nanogramas

NK – do inglês "natural killer"

nm – nanômetros

°C – graus Celsius

p - índice de probabilidade

pb – pares de base

PCR - do inglês "Polymerase chain reaction"

pH – potencial hidrogeniônico

pmol/μL – picomol por microlitro

q.s.p. – quantidade suficiente para

RC – razão de chances

RF – do inglês "rheumatic fever"

RNA – do inglês "ribonucleic acid"

rpm – rotações por minuto

SNP – do inglês “single nucleotide polymorphism”

TAE – tampão tris-acetato-EDTA

TBE – tampão tris-borato-EDTA

TCR – do inglês “T cell receptor”

Th – do inglês “T helper”

TNF- do inglês “Tumour necrosis factor “

TNF α (TNFA) – do inglês “Tumour necrosis factor alpha ” (gene)

TNFRF1A – do inglês “Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a”

TNFRF1B – do inglês “Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b”

T $^{\circ}$ A – temperatura ambiente

U – unidades

UV – ultravioleta

vs – do latim “*versus*”

μ g – microgramas

μ L – microlitro

μ M – micromolar

Lista de Tabelas		Pág.
Tabela 1	Sistema de escore para diagnóstico de HAI, revisado em 1999	6
Tabela 2	Número de alelos de HLA conhecidos	19
Tabela 3	Seqüências dos iniciadores utilizados, temperaturas de hibridização, enzimas de restrição e tamanhos dos produtos de PCR, antes e após digestão enzimática.	48
Tabela 4	Seqüência dos iniciadores, temperatura de hibridização e tamanho dos fragmentos dos produtos de PCR	51
Tabela 5	Identificação, localização e seqüência dos iniciadores 5' para a detecção dos diferentes alelos do gene MICA	56
Tabela 6	Identificação, localização e seqüência dos iniciadores 3' para a detecção dos diferentes alelos do gene MICA	57
Tabela 7	Misturas de iniciadores utilizadas na 1ª PCR, para a detecção dos diferentes alelos/grupo de alelo e o tamanho do produto de PCR obtido	58
Tabela 8	Misturas de iniciadores utilizados na 2ª PCR, para a detecção dos diferentes alelos/grupo de alelo e o tamanho do produto de PCR obtido	59
Tabela 9	Comparação entre as freqüências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs -308A/G e -238A/G do gene <i>TNFA</i> entre pacientes com HAI e controles	68
Tabela 10	Comparação entre as freqüências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs +80A/C e +252A/G do gene <i>LTA</i> entre pacientes com HAI e controles	69

Tabela 11	Comparação entre as frequências (%) genotípica e alélica do SNP -63T/A do gene <i>NFKBIL</i> entre pacientes com HAI e controles	69
Tabela 12	Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs – 348C/T e -22C/G do gene <i>BAT-1</i> entre pacientes com HAI e controles.	71
Tabela 13	Alelos do gene <i>MICA</i> e <i>HLA-B</i> em pacientes com HAI-1 e nos controles, distribuídos em <i>HLA-DRB1*03</i> e <i>HLA-DRB1*13</i>	72
Tabela 14	Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs do gene <i>TNFR1</i> e <i>TNFR2</i> entre pacientes com HAI e controles	73
Tabela 15	Comparação das frequências haplótípicas (%) dos genes, <i>HLA-DRB1</i> , <i>TNFA-238</i> , <i>TNFA-308</i> , <i>LTA+252</i> , <i>LTA+80</i> , <i>NFKBIL1-63</i> , <i>BAT1-348</i> , <i>BAT1-22</i> , <i>MICA</i> e <i>HLA-B</i> entre pacientes com HAI-1 e controles	75
Tabela 16	Comparação das frequências haplótípicas (%) dos SNPs <i>TNFA-238</i> , <i>TNFA-308</i> , <i>LTA+252</i> , <i>LTA+80</i> , <i>NFKBIL1-63</i> , <i>BAT1-348</i> e <i>BAT1-22</i> , presentes no MHC entre as classes II e I entre pacientes com HAI-1 e controles	76
Tabela 17	Comparação entre as frequências (%) dos alelos do gene <i>HLA-DRB1</i> e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1	76
Tabela 18	Comparação entre as frequências (%) haplótípicas dos genes <i>HLA-DRB1</i> , <i>TNFA-238</i> , <i>TNFA-308</i> , <i>LTA+252</i> , <i>LTA+80</i> , <i>NFKBIL1-63</i> , <i>BAT1-348</i> , <i>BAT1-22</i> , <i>MICA</i> e <i>HLA-B</i> presentes no MHC e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1	77

Tabela 19	Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos -589C/T, +33C/T e +3017G/T do gene <i>IL-4</i> entre pacientes com HAI e controles	79
Tabela 20	Comparação entre as frequências (%) genotípica e alélica do gene <i>IL-5 -746C/T</i> entre pacientes com HAI e controles	79
Tabela 21	Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNP Arg110Gln do gene da <i>IL-13</i> entre pacientes com HAI e controles	80
Tabela 22	Comparação entre as frequências (%) genotípica e alélica dos SNPs do gene <i>IL4R50</i> entre pacientes com HAI e controles	81
Tabela 23	Comparação entre as frequências (%) genotípica e alélica do SNP do gene <i>IL13Ra1398</i> entre pacientes com HAI e controles	81
Tabela 24	Comparação das frequências haplotípicas (%) dos SNPs <i>IL5-746</i> , <i>IL13110</i> , <i>il4-589</i> e <i>IL433</i> , presentes no cromossomo 5q, entre pacientes com HAI-1 e controles	83
Tabela 25	Comparação entre as frequências (%) do SNP <i>IL4+33</i> e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1	83
Tabela 26	Comparação entre as frequências (%) haplotípicas entre os SNPs <i>IL5 -746T/C</i> , <i>IL-13 110 Arg/Gln</i> , <i>IL-4 - 589C/T</i> , <i>IL4 +33 C/T</i> , presentes no cromossomo 5 e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1	84
Tabela 27	Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs -592A/C, -1082A/G, -2763A/C, -2849A/G, -3575A/T do gene <i>IL-10</i> entre pacientes com HAI e controles	86

Tabela 28	Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs do receptor de IL-10, <i>IL10R138</i> e <i>IL10R330</i> entre pacientes com HAI e controles	87
Tabela 29	Comparação das frequências haplótípicas (%) dos SNPs <i>IL10-3573</i> , <i>IL10-2849</i> , <i>IL10-2763</i> , <i>IL10 -1082</i> e <i>IL10-592</i> , presentes na região promotora do IL10, entre pacientes com HAI-1 e controles	88
Tabela 30	Comparação entre as frequências (%) do SNP <i>IL10-592</i> e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1	88
Tabela 31	Comparação entre as frequências (%) haplótípicas entre os SNPs <i>IL10-3573</i> , <i>IL10-2849</i> , <i>IL10-2763</i> , <i>IL10 -1082</i> e <i>IL10-592</i> , presentes na região promotora do IL10, e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1	89

RESUMO

Oliveira LC. **Estudo do polimorfismo genético na hepatite auto-imune na infância: busca de genes e haplótipos de susceptibilidade.** São Paulo, 2008. 140p: Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A hepatite auto-imune (HAI) é uma doença inflamatória crônica do fígado, de etiologia desconhecida, que acomete preferencialmente mulheres, com destruição progressiva do parênquima hepático e que, sem tratamento imunossupressor, evolui freqüentemente para cirrose. É uma doença rara na infância, com menos de 10% dos pacientes com doença hepática crônica, porém de alta mortalidade. Caracteriza-se pela presença de hipergamaglobulinemia, auto-anticorpos não órgãos-específicos e infiltrado inflamatório portal linfoplasmocitário. Cerca da metade dos pacientes atendidos no Instituto da Criança, apresenta também níveis elevados de IgE, sem causas aparentes como parasitoses ou atopia. A suscetibilidade genética à doença está principalmente associada a genes que codificam as moléculas de histocompatibilidade (HLA). A presença do HLA-DR é importante, mas não suficiente para o desenvolvimento dessa doença rara, fazendo inclusive supor um forte componente externo/ambiental no desencadeamento da doença. Genes recém descritos, localizados na região de classe III do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) e ligados ao controle da resposta imune, em especial, alguns próximos à junção com a região de classe I, têm sido investigados como "loci" secundários para o desenvolvimento de doenças auto-imunes. A forte associação da HAI com genes na região do MHC, bastante comuns na população, aliada a incidência muito baixa da doença, leva à questão da presença de genes adicionais de suscetibilidade, que, junto com o *HLA-DR*, seriam responsáveis pela suscetibilidade genética observada. Dessa forma, o *HLA-DRB1*13*, além de um fator por si, também pode ser um marcador da região cromossômica, ou seja, de um haplótipo específico e que, portanto, carrega mais de um gene de suscetibilidade. Estudamos polimorfismos, tipo SNP, de

genes próximos ao *HLA-DRB1*, como *TNFA*, *LTA*, *NFKBIL1* e *BAT1*, buscando haplótipos de susceptibilidade à doença, em pacientes HAI-1 (n=105) e controles sadios (n=227). O haplótipo ancestral 8.1 que inclui *HLA-DRB1*03* e o alelo raro na posição -308 do gene *TNFA* estava aumentado (p=0.0005). Já o alelo *HLA-DRB1*13*, presente na maioria dos pacientes, não mostrou haplótipo específico associado. Também avaliamos genes de citocinas envolvidas na produção de IgE, elevado em parte dos pacientes HAI-1. Na comparação com controles, a frequência dos SNPs *IL-4+33* e *IL13+110*, localizados em genes vizinhos, apresentou aumento estatisticamente significativo nos pacientes, sugerindo haver um grupo gênico adicional no cromossomo 5q31 envolvido na susceptibilidade à HAI.

Descritores: 1-Hepatite auto-imune/genética; 2- Polimorfismo genético/genética;3-Complexo Principal de Histocompatibilidade/genética; 4- Citocinas/ imunologia; 5-Predisposição genética para doença/genética

SUMMARY

Oliveira LC. **Study of genetic polymorphism in children: searching for susceptibility genes and haplotypes.** São Paulo, 2008. 140p: Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Autoimmune hepatitis (AIH) is an inflammatory chronic liver disease of unknown etiology found predominantly in females, leading when untreated, to cirrhosis. It is a rare disease in the childhood, corresponding to about 10% of patients with chronic hepatitis, but exhibits high mortality. It is characterized by hipergammaglobulinemia, organ nonspecific circulating autoantibodies, and an inflammatory liver-infiltrating lymphocytes and plasma cells. Almost half of patients investigated at Instituto da Criança had increased plasma IgE levels, without any apparent cause such as parasite infestation or atopy. Genetic predisposition to AIH has been mainly linked to genes coding for HLA class II molecules. *HLA-DR* is important but not sufficient to explain this rare disease, suggesting there is an external/environmental component triggering the disease. Recently, several genes in the class III region of MHC, linked to immune responses, especially near the junction with the MHC class I region have been investigated as secondary loci for autoimmune disease susceptibility. The strong association of AIH with genes in the MHC region, common in the population, but a disease with the very low incidence, suggests additional genes linked with *HLA-DR* could add to the disease susceptibility. So, *HLA-DR*13* besides being a factor by itself, could also be a chromosomal region marker, taking part of a specific haplotype carrying more than one susceptibility gene. We studied single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes near *HLA-DRB1*, like *TNFA*, *LTA*, *NFKBIL1* and *BAT1* searching for disease susceptibility haplotypes, in HAI-1 patients (n=105) compared to healthy controls (n=227). The ancestral haplotype 8.1, which includes *HLA-DRB1*03* and the rare *TNFA* allele at position -308 was increased (p=0.0005). However, *HLA-DRB1*13*, though present in the majority of the patients, did not show any specific haplotype associated to it.

We also analyzed cytokine genes involved in IgE production, which is increased in a part of the AIH type 1 patients. In comparison with controls, the frequency of the SNPs *IL-4+33* and *IL13+110* was significantly increased, suggesting the existence of an additional gene cluster in chromosome 5q31 involved in the susceptibility to AIH.

Descriptors: 1-Hepatitis autoimmune/genetics; 2-Genetic Polymorphism/genetics; 3-Major Histocompatibility Complex/genetics; 4-Cytokines/immunology; 5-Genetic predisposition to disease/genetics

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações históricas

A hepatite auto-imune foi descrita na década de 50, por Waldenström (Manns, 1999) estudando uma série de casos de mulheres jovens com uma forma de hepatite grave, associada à presença de acne, aranhas vasculares, amenorréia, elevação marcada das concentrações séricas de gamaglobulina e de curso invariavelmente fatal. Em 1956, Mackay et al. introduziram o conceito de hepatite “lupóide” para designar quadros de disfunção hepática associados à positividade para a pesquisa de células LE; posteriormente demonstrando a mesma associação para o fator anti-nuclear (FAN), pois os pacientes tinham anticorpos anti-nucleares no soro, células de lúpus eritematoso (LE) e doença multi-sistêmica. Como apenas poucos casos de hepatite crônica auto-imune satisfazem critérios para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (LES), houve, no início, uma discussão sobre a individualidade dessa síndrome. Atualmente, a terminologia correta é hepatite auto-imune (HAI), que corresponde a cerca de 20% dos casos de hepatite crônica. A utilização da pesquisa de anticorpos anti-músculo liso contribui para a distinção entre essas duas doenças, uma vez que esses auto-anticorpos não ocorrem no LES (Mackay, 1991).

1.2. Descrição da doença

A hepatite auto-imune (HAI) é uma doença inflamatória crônica do fígado, de etiologia desconhecida, que acomete, preferencialmente, mulheres, onde há destruição progressiva do parênquima hepático e que, na ausência de tratamento imunossupressor, evolui freqüentemente para cirrose. A maioria dos pacientes com HAI responde satisfatoriamente à terapêutica imunossupressora, com remissão clínica, laboratorial e histológica. É uma doença rara na infância, correspondendo a menos de 10% dos pacientes com doença hepática crônica, porém de alta mortalidade. No Brasil, compreende a cerca de 5 a 10% das doenças hepáticas nos principais centros de Gastroenterologia do país (Silva et al., 1986).

A prevalência da HAI, baseada em estatísticas da Europa setentrional, situa-se em torno de 17 casos por 100.000 habitantes, com uma incidência anual de 1,9 casos por 100.000 habitantes (Czaja, 2001) No Brasil, a sua prevalência foi estimada em 3,3%; dados estes apresentados em um “Inquérito Nacional sobre Hepatite Auto-imune” em adultos (XVI Congresso Brasileiro de Hepatologia em 2001).

A doença caracteriza-se pela presença de hipergamaglobulinemia, auto-anticorpos não órgão-específicos e infiltrado inflamatório portal linfoplasmocitário, associado à necrose em saca-bocados e rosetas de hepatócitos. Ela é classificada em dois tipos, de acordo com a presença de diferentes auto-anticorpos: tipo 1 (HAI-1), pela positividade para o anticorpo anti-músculo liso (AAML) e/ou anticorpo anti-actina (AAA), e/ou anticorpo

anti-núcleo (ANA), e tipo 2 (HAI-2), pela presença de anticorpo anti-microsoma de fígado e rim tipo 1 (AAMFR-1) e/ou anti-citosol hepático tipo 1 (AACH-1) (Alvarez et al., 1999).

1.3. Quadro clínico e diagnóstico

A história natural e o prognóstico da hepatite auto-imune dependem do grau de atividade da doença e da presença ou não de cirrose hepática. Elevação persistente de aminotransferases séricas (ALT ou AST), acima de 5 a 10 vezes do limite de normalidade, na presença de níveis séricos elevados de gamaglobulina, associa-se com aumento da mortalidade, que pode chegar a 90% em dez anos, na ausência de tratamento imunossupressor. A mortalidade em pacientes com cirrose, não tratados, é de 58% em cinco anos, sendo que a presença de cirrose parece não influenciar na resposta terapêutica (Soloway et al., 1972)

Nos adultos, em cerca de 50% dos casos, o início da doença é insidioso, com pacientes apresentando fadiga, náuseas, anorexia, perda de peso, dor ou desconforto abdominal, icterícia, rash cutâneo, artralgias e mialgias, podendo apresentar hepatoesplenomegalia, ascite, eritema palmar, aranhas vasculares, edema periférico e encefalopatia. Cerca de 30% dos pacientes adultos apresenta, já de início, quadro agudo com icterícia, sendo essencial a identificação precoce para evitar a progressão da doença. Os casos restantes são assintomáticos e são identificados pelo achado acidental de aumento de aminotransferases (McFarlane et al., 2002).

O diagnóstico da HAI é baseado em achados clínicos, laboratoriais, histológicos e genéticos (Tabela 1). Esses critérios e o tratamento não diferem entre os dois grupos. Entretanto, pacientes com HAI-2 têm algumas características clínicas distintas, como idade de início da doença mais precoce, maior frequência de hepatite fulminante, menores níveis de gamaglobulinas e maior índice de deficiência de IgA (Porta G. 1993, Bittencourt et al., 1999). Na HAI-1, observamos que várias crianças apresentam também altos níveis de IgE circulante (Porta et al., 2004). O motivo dessa elevação não é conhecido. Fatores que comumente elevam IgE no sangue, como infecções parasitárias ou asma/atopia não estão presentes nesse grupo de doentes.

Tabela 1- Sistema de escore para diagnóstico de HAI, revisado em 1999.

Parâmetros	Escore
Sexo	
Feminino	+2
Bioquímica hepática	
Relação de elevação acima de valores normais de FA/AST ou ALT	
<1,5	+2
1,5 – 3,0	0
>3,0	-2
Níveis séricos de globulinas ou gamaglobulinas ou IgG (nº de vezes acima do limite normal)	
>2,0	+3
1,5 – 2,0	+2
1,0 – 1,5	+1
<1,0	0
Auto-anticorpos (títulos por IFI em cortes de rato)	
FAN, AAML, AAMFR-1	+3
>1/80	+2
1/80	+1
1/40	0
<1/40	
AAM	
Positivo	-2
Crianças com títulos <1/80, principalmente AAFR-1	+1
Marcadores virais (VHA, VHB, VHC, CMV, EB)	
Positivo	-3
Negativo	+3
História de drogas (recente ou uso contínuo ou suspeita de drogas hepatotóxicas)	
Positiva	-4
Negativa	+1
Consumo alcoólico	
< 25g/dia	+2
>60g/dia	-2
Histologia	
Hepatite por interface	+3
Roseta de hepatócitos	+1
Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário acentuado	+1
Nenhum dos acima	-5
Alterações biliares	-3
Outras alterações: granulomas, siderose e depósitos de cobre sugestivo de diferente etiologia	-3
Outras doenças auto-imunes (paciente ou familiares de primeiro grau)	+2
soropositividade para outro autoanticorpo definido	+2
pANCA, anti-citosol-1, anti-SLA, anti-ASGP-R, anti-antígeno de membrana plasmática de hepatócito humano ou glicosíngolípide de membrana plasmática de hepatócitos, anti-sulfatide	
Marcados genéticos	
HLA DR3 ou DR4 (outros HLA em diferentes populações).	+1
Resposta terapêutica	
Completa	+2
Recaídas	+3

Interpretação do escore

1. Pré-tratamento: a. Definitivo >15 / b. Provável 10-15

2. Pós-tratamento: a. Definitivo >17 / b. Provável 12-17

O diagnostico diferencial deve ser feito com: hepatite aguda viral, doença de Wilson, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária (CEP).

1.4. Imunologia do Fígado

O fígado é um órgão imune privilegiado, considerado um órgão linfóide com propriedades únicas. Devido à sua localização e função, está constantemente exposto a uma grande variedade de antígenos, derivados de alimentos, patógenos, toxinas e antígenos originados no estômago. Sabe-se que antígenos provenientes da veia porta levam à tolerância imunológica. Ainda, os próprios hepatócitos tendem a produzir neo-antígenos, tais como proteínas derivadas de metabolitos tóxicos, que devem ser barrados do reconhecimento por células de resposta imune (Knolle et al., 2001) residentes no tecido hepático. Apesar de antígenos inofensivos derivados de alimentos poderem ser tolerados, uma resposta imune contra antígenos microbianos deve ser eficientemente produzida. Uma variedade de células apresentadoras de antígenos está presente no fígado, e inclui células dendríticas, macrófagos residentes chamados de células de Kupffer, e as células endoteliais dos sinusóides hepáticos (LSEC). Linfócitos aparecem em número expressivo dentro do fígado (Mackay, 2002) e incluem células T CD4+, células T CD8+, células T $\gamma\delta$, células NK e células NKT, cuja maior porcentagem expressa, em sua superfície, receptores de célula T invariantes (iNKT). Apesar da presença de muitos tipos de células de resposta imune dentro do fígado, o panorama no tecido hepático é o de indução de tolerância imunológica. Linfócitos T virgens, que entram na circulação hepática podem ser destruídos por apoptose, mediada por Fas (Liu et al., 2001).

As LSEC correspondem à metade das células não parenquimatosas do fígado e têm um papel essencial na indução de tolerância no fígado. Hepatócitos são circundados por LSEC, e que, por diversos mecanismos montam uma barreira eficiente contra um ataque imune não desejado (Limmer et al., 2000, revisado por Goldberg et al., 2007).

1.5. Auto-imunidade

A auto-imunidade é resultado de complexas interações entre fatores ambientais, genéticos e a resposta imune.

O mecanismo imune que controla o fenômeno da auto-imunidade é a tolerância imunológica, que é de um estado de não-responsividade a um determinado antígeno e é induzida por prévia exposição a ele. A tolerância pode ser induzida para antígenos não-próprios, mas o aspecto mais importante da tolerância é a modulação negativa da resposta gerada pelo reconhecimento de auto-antígenos por células que integram o sistema imune adaptativo, impedindo que o organismo elabore um ataque contra seus constituintes próprios.

Ativação e expansão clonal de linfócitos auto-reativos são passos cruciais para a patogênese das doenças auto-imunes. Clones de células B e T auto-reativos existem normalmente no organismo e a reatividade dos mesmos é controlada por mecanismos reguladores.

O principal mecanismo responsável pela ausência de reação imunológica contra antígenos próprios é a deleção clonal de células T auto-

reativas em desenvolvimento, que ocorre no timo: é a chamada tolerância central. Durante o processo de diferenciação e maturação dos linfócitos T, são eliminadas aquelas células T cujos receptores (TCR) reconhecem peptídeos associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) com alta afinidade. Sobrevivem à apoptose, ou morte programada, apenas as células T que interagem com baixa afinidade para as moléculas CPH e que apresentam os peptídeos próprios presentes nos sulcos dessas moléculas (Janeway Jr et al., 2002).

Além deste mecanismo de tolerância central, que remove linfócitos com potencial auto-reativo, existe a tolerância periférica. Esta tolerância é induzida naquelas células T capazes de reconhecer auto-antígenos que não estavam presentes na ontogenia das células T no timo ou, estavam presentes, mas em quantidade insuficiente (Arnold et al., 1997; Kamradt e Mitchison, 2001). Após a maturação e saída dos linfócitos do timo, existem vários mecanismos periféricos que previnem a ocorrência de auto-imunidade, constituindo fatores importantes de tolerância. Um destes mecanismos consiste na anergia causada pela ausência de um sinal co-estimulador, necessário à ativação das células T em adição ao sinal fornecido pela ligação entre o TCR e o complexo CPH/antígeno.

Além da anergia, há a produção de citocinas imunossupressoras e a existência de subpopulações de linfócitos imunossupressores como as células T reguladoras (Treg).

O CPH reconhece antígenos diferentes por meio de dois tipos de moléculas. As moléculas de classe I apresentam às células T CD8+,

peptídeos derivados de proteínas sintetizadas intracelularmente, tais como proteínas virais em células infectadas, enquanto que as moléculas de classe II apresentam peptídeos derivados de produtos endocitados ou fagocitados, que são primariamente reconhecidos por células T CD4+. Estas têm, em geral, expressão restrita às células apresentadoras de antígeno (CAAs) como as células dendríticas, células B e macrófagos (Rocha et al., 2008). Dessa forma, as duas classes de moléculas de CPH apresentam peptídeos de diferentes compartimentos celulares na superfície celular, onde são reconhecidas por diferentes tipos de células T que desempenham função efetora apropriada. Falhas nessa apresentação de antígenos podem levar ao reconhecimento cruzado, culminando com uma resposta auto-imune.

Ainda, falhas no mecanismo de indução à tolerância levam à expansão de clones auto-reativos de célula T, que podem permanecer na circulação periférica, quando existir falha na sinalização das vias de ativação de célula T associada a uma resistência à apoptose. A morte da célula T é desencadeada, entre outras, pela via que envolve a molécula Fas e o seu ligante (FasL). O aumento da expressão da molécula Fas em células apresentadoras ativadas induz a apoptose das células T via o ligante de Fas.

Por outro lado, a apresentação de antígenos na ausência de co-estimuladores leva a falhas de ativação da célula T e pode culminar em anergia e em morte celular. Células T reguladoras podem inibir ou suprimir outras células T por meio da produção de citocinas como a IL-10 e o fator transformante de crescimento beta (TGF- β) (Kamradt e Mitchison, 2001). Se uma célula T, após o seu contato com o antígeno, não produzir IL2, ela não

estará completamente ativada e ficará anérgica. Muitas células T nesta situação produzem IL-10, que suprime a ativação de outras células T (Buer et al., 1998). A ativação de células T auto-reativas pode ser promovida pela presença de agentes infecciosos, pois, muitos destes agentes possuem antígenos muito semelhantes a auto-antígenos, uma situação denominada mimetismo molecular ou reatividade cruzada (Benoist e Mathis, 1998).

1.6. Patogenia da hepatite auto-imune

Na hepatite auto-imune, a presença de linfócitos no fígado está comumente associada à patogênese da doença. A infiltração de linfócitos é bem conhecida nos processos inflamatórios, como nas doenças auto-imunes e virais do fígado. Esses linfócitos parecem ter papel ativo no dano hepático e na necrose. Os achados histológicos são predominantemente de células T CD4+ e em menor quantidade células T CD8+, células NK, macrófagos e linfócitos B, compondo as diferentes vias pelas quais o sistema imune pode acarretar dano aos hepatócitos (Vergani e Mieli-Vergani, 2004).

O agente desencadeante da HAI permanece ainda desconhecido. Na hipótese de mimetismo molecular, a reatividade cruzada tem sido aventada ser uma propriedade inerente à ontogenia imune, onde peptídeos ligantes alterados (APL), que têm estrutura similar a peptídeos antigênicos, seriam capazes de induzir resposta tanto inibidora quanto estimuladora das células T. Esses ligantes endógenos operariam, ainda, selecionando o repertório de células T no timo. Assim, uma única célula T seria capaz de reagir

cruzadamente em resposta a numerosos antígenos, expandindo a especificidade antigênica do sistema imune a ponto de refletir a diversidade antigênica do ambiente externo. Esse potencial de reação cruzada, que pode permitir respostas eficientes a uma vasta gama de patógenos, também faz com que o sistema imune tenha um potencial de reagir contra antígenos próprios, levando à auto-imunidade (Vergani et al., 2008)

Entretanto, não pode ser descartado um gatilho por um patógeno ainda desconhecido, que poderia também, variar conforme a região ou país, levando ao reconhecimento cruzado e desencadeando a auto-imunidade a partir de epitopos diferentes (Mackay et al., 2004). Além disso, mesmo na ausência de um patógeno identificável, é possível que uma suscetibilidade anômala a lesões leve ao aparecimento, no próprio tecido hepático, de neo-antígenos ou antígenos crípticos, previamente seqüestrados ou escondidos, que se tornam, então, alvos do reconhecimento pelo sistema imune. Esta poderia ser uma explicação para a presença forte de resposta humoral anti-actina filamentosa na HAI-1 e mesmo anticorpo anti-citocromo P 450, isoforma 2D6 (CYP2D6) na HAI-2.

A HAI-1 caracteriza-se pela presença de anticorpos circulantes dirigidos contra o músculo liso, associados ou não a anticorpos anti-núcleo. O anticorpo anti-músculo liso (AAML) aparentemente reconhece estruturas do citoesqueleto e parece reagir com filamentos de actina polimerizada.

A hepatite auto-imune tipo 2 é caracterizada pela soropositividade para anticorpos anti-microsoma de rim e fígado (LKM1), que são dirigidos contra a isoforma 2D6 (CYP2D6), um membro da família das enzimas

hepáticas P450, que, na reação de imunofluorescência, cora os hepatócitos e túbulos renais proximais. Esses anticorpos parecem reagir cruzadamente com regiões homólogas de CYP2D6 e dos vírus HCV, HSV e CMV, sugerindo que múltiplas exposições a esses patógenos (CMV e HSV) possam levar a um reconhecimento cruzado de células T em indivíduos geneticamente suscetíveis e desencadear um processo auto-imune. Da mesma maneira, a infecção crônica pelo vírus C também pode levar ao aparecimento de auto-anticorpos anti-LKM por mecanismos cruzados (Vergani et al., 2008).

Em virtude de sua função na resposta imune e do elevado grau de polimorfismo, os genes HLA de classe II estão entre os mais investigados para as associações com doenças auto-imunes. A variação das moléculas HLA é devido aos aminoácidos localizados no sítio de ligação dos peptídeos antigênicos e definem a especificidade e a afinidade da ligação destes peptídeos. Portanto, estas moléculas interferem na capacidade de um indivíduo montar uma resposta imune a um antígeno, sendo ele estranho ou próprio (Todd, 1999).

1.7. Polimorfismo genético

O polimorfismo genético tem um papel importante na auto-imunidade, uma vez que é o responsável por alterar sítios de reconhecimento antigênico, a ligação de citocinas a seus ligantes, a produção das mesmas e a expressão de proteínas modificadas.

Um “locus” é considerado polimórfico quando o alelo comum está presente em menos de 99% da população (Cavalli-Sforza e Bodmer, 1971 apud Granja et al., 1996). Formas alternativas (variantes) de um gene são denominadas alelos e indicam uma alteração de um ou mais nucleotídeos na sua seqüência. Quando a troca do nucleotídeo não leva a alteração da leitura, dizemos que houve uma troca silenciosa. Já a alteração do código de leitura para os diferentes aminoácidos pode levar à troca não-sinônima, o que implica na expressão de uma proteína diferente. Esta substituição pode ser por um aminoácido semelhante (ex: leucina por isoleucina) ou diferente (ex: lisina por ácido aspártico), configurando uma troca conservada ou não conservada, respectivamente. Finalmente, a alteração do códon pode implicar numa troca sinônima, que também representa um novo alelo, mas não uma alteração de proteína expressa e é somente detectada por métodos de biologia molecular. O tipo de substituição é importante, pois pode resultar em modificação substancial da molécula, e portanto do leque de peptídeos que esta poderá apresentar.

Cada conjunto de alelos ou variantes correspondentes aos diferentes genes encontrados em proximidade, numa região cromossômica, é denominado de haplótipo. Os genes num haplótipo tendem a segregar juntos, passando em bloco de uma geração à próxima. Em outras palavras, cada indivíduo herda um haplótipo do pai e outro da mãe.

Os mecanismos que originam as variantes alélicas (mutação) devem ser distinguidos daqueles que determinam sua propagação dentro de uma população (seleção), isto é, estabilização de sua freqüência.

As variantes silenciosas são seletivamente neutras entre si, podendo variar sua frequência ao acaso. No entanto, parte das variantes alélicas está associada a diferenças funcionais nas moléculas geradas. As variantes sinônimas sofrem menos efeito da seleção que as variantes não-sinônimas. Estas são selecionadas positivamente quando oferecem vantagens para a sobrevivência da população, sendo a base da evolução por meio da seleção natural.

1.7.1. Polimorfismo genético no Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) ou Major Histocompatibility Complex (MHC) tem sido um dos sistemas genéticos mais amplamente estudados em mamíferos, devido a sua relevância em transplantes, controle da resposta imune e associação com doenças. Foi descoberto na década de 40, durante os primeiros transplantes experimentais de tecidos entre animais, onde as moléculas codificadas por genes desse complexo foram inicialmente identificadas em camundongos (sistema H-2) e, posteriormente, descritas em humanos por Dausset (1958), como antígenos de transplantação devido a sua característica de indução de rejeição. Os genes responsáveis pela rejeição foram inicialmente identificados na superfície de leucócitos, sendo, por isso, denominados antígenos leucocitários humanos – HLA (“Human Leukocyte Antigen”). O sistema HLA em humanos é muitas vezes referido como CPH. No entanto, sabemos hoje que a região do CPH abrange um número muito maior de

genes.

O CPH humano, localizado no cromossomo 6, compreende aproximadamente 3,6 Mb de extensão, com mais de 200 genes, 128 dos quais são expressos (57,1%). Deste total, 51 genes (39,8%) estão diretamente envolvidos na resposta imune. Está dividido em 3 regiões: classe II (1,1Mb), classe III (0,7Mb) e classe I (1,8Mb), do centrômero para o telômero (*The CPH Sequence Consortium*, 1999). A região de classe I apresenta, entre outros, os genes que codificam as moléculas HLA de classe I clássicas (HLA-A, -B e -C). A região de classe II contém os genes que codificam as moléculas de classe II (HLA-DR, -DQ e -DP). A região de classe III está localizada entre as regiões de classe I e II e contém mais de 35 "loci", que codificam, entre outros, componentes do sistema complemento (C2, C4A, C4B, Bf) e a enzima 21-hidroxilase. Os genes que codificam para as proteínas de choque térmico *HSP70*, fator de necrose tumoral ($\text{TNF}\alpha$) e linfotoxinas ($\text{LT}\alpha$ e $\text{LT}\beta$), estão mapeados entre o complemento e as regiões de classe I (Horton et al., 2004).

O CPH, e mais especificamente, o sistema HLA, é conhecido como a região mais polimórfica do genoma humano. O polimorfismo do sistema HLA tem como origem mais provável, fenômenos de duplicação seguidos de eventos de conversão gênica e mutação pontual (Bodmer, 1997). Na mutação pontual ocorre a substituição, inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos dentro de um único gene. Na conversão gênica ocorre a troca transversal de segmentos semelhantes entre genes vizinhos. Neste processo o segmento daquele gene em particular torna-se idêntico a uma

porção correspondente de um gene relacionado, porém diferente.

No caso das moléculas HLA, a seleção natural está diretamente relacionada à sua capacidade de apresentar antígenos (peptídeos) originários do ambiente em que os indivíduos vivem. Dentro deste contexto, indivíduos heterozigotos apresentariam uma vantagem em relação ao homozigoto, quando da exposição a patógenos, uma vez que possuem maior número de variantes úteis na apresentação de antígenos. A este fenômeno chamamos de “sobredominância” ou “vantagem do heterozigoto”.

O HLA possui mais de 2.700 alelos distribuídos entre os genes das moléculas clássicas, além de outros alelos nos genes não clássicos, como os dos genes *MIC* e *TAP*. Dentro da região de classe I, o *HLA-A* e *B* são os mais polimórficos e na de classe II, o *HLA-DRB* é o mais polimórfico com mais de 570 alelos (Tabela 2).

A variação do HLA é um determinante essencial na rejeição a transplantes e na suscetibilidade a um grande número de infecções e doenças auto-imunes. Numerosos estudos têm demonstrado associação entre os genes *HLA* e a suscetibilidade a doenças. O desequilíbrio de ligação (LD) é um fenômeno importante nessa região gênica e resulta da co-segregação de alelos de genes próximos numa frequência maior do que seria esperada se a combinação desses alelos ocorresse ao acaso. O desequilíbrio de ligação existente entre genes *HLA* e outros genes próximos, dificulta a interpretação desses resultados. Assim, estudos têm sido realizados, buscando tipificar não só alelos HLA, mas também SNPs comuns nessa região, permitindo a identificação de haplótipos que estariam

envolvidos na suscetibilidade a doenças, ou pelo menos servindo como pré-triagem em grandes amostragens (populações) para seleção de estudos de determinadas doenças (Bakker et al., 2006).

Tabela 02 – Número de alelos de HLA conhecidos.

HLA Class I Alleles							1,839			
HLA Class II Alleles							875			
HLA Alleles							2,714			
Other non-HLA Alleles							102			
Gene	A	B	C	E	F	G				
Alleles	545	894	307	9	21	24				
Proteins	436	766	244	3	4	7				
Nulls	39	31	7	0	0	1				
Gene	H	J	K	L	P	U	T	V	W	X
Alleles	12	9	6	5	4	0	0	3	0	0
Proteins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nulls	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gene	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DOA	DOB
Alleles	3	577	34	83	23	126	4	7	12	9
Proteins	2	476	25	61	14	113	4	7	3	4
Nulls	0	7	1	1	0	2	0	0	1	0
HLA Class II - DRB Alleles										
Gene	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9	
Alleles	494	1	44	13	18	3	2	1	1	
Proteins	418	0	36	7	15	0	0	0	0	
Nulls	2	0	0	3	2	0	0	0	0	
Other non-HLA Genes										
Gene	MICA	MICB	TAP1	TAP2						
Alleles	61	30	7	4						
Proteins	52	20	5	4						
Nulls	0	2	1	0						
Component Information										
Number of Component Entries (EMBL/GenBank/DBJ)										6,139
Number of Source Cells/Individuals										4,325

Fonte <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>

1.7.2. Polimorfismo do tipo SNP

Um polimorfismo de nucleotídeo único, ou “single nucleotide polymorphism” (SNP), refere-se à mudança de uma única base no DNA. Os SNPs compreendem a mais abundante forma de variação no genoma humano, com uma frequência estimada variando de 1 em 300 a 1 em 2000 pares de bases. No genoma humano, com aproximadamente 3,2 bilhões de pares de bases, essa frequência equivale a um número entre 1,6 e 12 milhões de SNPs. Porém, os SNPs têm sido estimados em cerca de 15 milhões, sendo que há cerca de 1,4 milhões já identificados. Essa considerável diferença no número de SNPs pode ser explicada, parcialmente, pela variação do grau de polimorfismo nas diferentes regiões do genoma, ou ainda por diferenças com relação à própria definição de SNP (Lander et al., 2001). Algumas definições incluem nucleotídeos metilados e deaminados, outras não.

Mudanças de nucleotídeos entre bases purínicas e pirimidínicas são chamadas transversões, enquanto que mudanças dentro da mesma classe de bases são chamadas transições. O impacto das diferenças de nucleotídeos é variável, mas é claramente dependente de sua localização no genoma. Embora a maioria dos SNPs esteja fora das regiões codificadoras dos genes, há também SNPs localizados em éxons. Diferenças nas regiões à jusante (5') do gene podem influenciar na promoção ou repressão da transcrição gênica, resultando numa regulação diferencial da quantidade de proteína produzida. Polimorfismos no limite íntron/éxon podem ter efeito nas

posições ativadora ou silenciadora do processamento ou especialmente, em posições GT doadoras ou AC aceptoras, modificando o transcrito e gerando diferentes isoformas de um mesmo gene. Da mesma maneira, diferenças na região distal 3' podem ter efeitos adicionais, incluindo a interrupção da poliadenilação, com alteração da estabilidade do mRNA e/ou a eficiência da tradução (Shen et al., 1999).

A associação dos SNPs com doenças está primariamente relacionada ao que cada polimorfismo pode ter de efeito sobre a expressão ou função da proteína sintetizada. Entretanto, polimorfismos podem estar em desequilíbrio de ligação com outros presentes no mesmo gene ou em genes próximos. Esse fenômeno não ocorre de maneira uniforme no genoma, mas se distribui em blocos por todo o genoma. SNPs marcadores (em inglês: “tags”) destes blocos podem ser utilizados para rastrear a associação com doenças. Assim, apesar da maioria dos SNPs não apresentarem efeitos funcionais diretos, a associação entre eles poderia formar um haplótipo com uma variante funcional, servindo como marcador de uma doença (Botstein e Risch, 2003).

1.8. Função dos genes do CPH, presentes entre as classes II e I

Existem diversos genes não HLA codificados na região genômica do CPH, que podem estar envolvidos no controle de infecções e na suscetibilidade a doenças. Cerca de 30 desses genes têm um papel na regulação da inflamação, conferindo um viés de predisposição ou proteção a doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide, doenças com componente

inflamatório como a aterosclerose, e doenças resultantes de infecções como a malária. O choque séptico, a malária cerebral e a cardiomiopatia associada à hepatite C são formas clínicas graves associadas a variantes gênicas presentes na região do CPH, em especial a do fator de necrose tumoral (TNF) (Shichi et al., 2005).

1.8.1. Genes de resposta imune presentes no CPH estudados

Alguns genes polimórficos localizados na região de classe III do CPH, próximos à junção com a região de classe I, têm sido investigados como "loci" secundários para o desenvolvimento de doenças auto-imunes: "Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1" (*NFKBIL1*), "HLA-B Associated Transcript 1" (*BAT1*), *TNFA*, *LTA*. (Okamoto et al., 2003, Price et al., 2004, Cheong et al., 2001, Ota et al., 2001, Yamagushi et al., 2001).

O TNFa tem um papel importante na indução da inflamação e da apoptose. É uma citocina pró-inflamatória pleiotrófica, produzida por macrófagos, fibroblastos, células NK e linfócitos, entre outras. O gene que codifica o TNFa localiza-se na região de classe III do CPH, entre os genes *HLA-B* e *HLA-DR*. Vários polimorfismos foram descritos na região promotora deste gene. O *TNFA* apresenta um promotor polimórfico que atua na imunorregulação e na inflamação (Jacob et al., 1990; Pociot et al., 1995) e está associado à patogenia de diversas doenças auto-imunes como a febre reumática (Ramasawmy et al., 2007), a cardiomiopatia da doença de

Chagas (Drigo et al., 2006), esclerose múltipla (Tolusso et al., 2005) e o diabetes tipo 1 (Bouqbis et al., 2003). O efeito biológico do TNFa é determinado pela ligação a dois receptores cognatos, o receptor 1 de TNF (TNFRFIA ou TNFR1) (p55) e o receptor 2 de TNF (TNFRSFIB ou TNFR2) (p75), ambos envolvidos na regulação de outras citocinas e moléculas pela ativação de fator κ B nuclear (NF κ B). O TNFR1 liga-se ao TNF com baixa afinidade e o TNFR2 age aumentando a afinidade entre o TNF e o receptor 1. A ativação de TNFR1 pode induzir ou inibir apoptose, dependendo do tipo de célula e de seu estado de ativação. De modo geral, a ativação de NF κ B mediada pelo receptor 1 de TNF parece proteger contra apoptose. Já a sua capacidade de induzir apoptose é mediada por meio de uma via de domínio de morte intracelular. Por outro lado, a regulação do TNFR2 pode ter implicações na concentração de TNFa, uma vez que ele modula a afinidade do TNFR1 ao TNFa. Polimorfismos tipo SNP nesses receptores têm sido identificados, porém dados funcionais sobre esses polimorfismos são ainda raros e eles têm sido avaliados apenas em estudos de associação genética com doenças (Nishimura et al., 2003; Waschke et al., 2005).

A linfotoxina alfa (LTa) é uma proteína solúvel, liberada por linfócitos ativados por antígenos ou mitógenos. Está envolvida em processos alérgicos e em doenças inflamatórias crônicas. Ela pertence à família do TNF e liga-se aos seus receptores, o TNFR1 e TNFR2 (Sacca et al., 1998). É uma citocina de vital importância, mediadora precoce de respostas imunes e inflamatórias. Seu gene encontra-se muito próximo ao gene *TNFA*. Relatos indicam que polimorfismos no íntron 1, posição 252 do gene da *LTA* estão

associados com a suscetibilidade ao infarto do miocárdio (Ozaki et al., 2002), à sepse bacteriana (Holmes et al., 2003) e a algumas doenças auto-imunes, como a sarcoidose (Yamagushi et al., 2001).

A proteína I κ BL pertence à família da proteína I κ B, que regula a bio-disponibilidade do NF κ B, um fator presente no citosol das células e que se desloca para o núcleo quando ativado, regulando a expressão de mais de 200 genes envolvidos na resposta imune, no crescimento e na inflamação, incluindo TNF α , IL-1 e IL-6 (Carlsen et al., 2004). O gene que codifica proteína I κ BL também é conhecido por *NFKBIL1* (Okamoto et al., 2003). Polimorfismos na região promotora do gene *NFKBIL1* parecem estar associados à suscetibilidade genética para a artrite reumatóide.

A proteína BAT1 pertence à família DEAD-box. Essa família inclui proteínas encontradas em todas as células eucariotas, mas estão presentes principalmente em macrófagos e hepatócitos. O gene *BAT1* está localizado na região de classe III do CPH, 30kb telomérico ao *TNFA* e próximo ao gene *NFKBIL1*. O gene *BAT1* codifica um membro da família do DEAD-box de ATPases dependentes de RNA que medeiam a hidrólise do ATP durante o processamento do pré-mRNA. A proteína codificada é um fator essencial de processamento, requerida para associação da pequena ribonucleoproteína nuclear U2 com pré-mRNA e também tem papel importante na exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma (Price et al., 2004). Esse gene tem sido associado a doenças de origem auto-imunes, como a diabetes tipo I (Cheong et al., 2001) e a artrite reumatóide (Ota et al., 2001). Ele parece regular negativamente a produção de citocinas inflamatórias (Allcock et al.,

2001), mas o papel funcional das variantes polimórficas não é conhecido.

1.8.2. Genes HLA não clássicos estudados: “MHC class I chain-related gene A” (*MICA*)

A função da molécula MICA ainda não está totalmente esclarecida, mas dados indicam ser uma molécula ligante para células com atividade citotóxica. A interação de MICA com receptor “natural-killer group 2, member D” (NKG2D), presente em linfócitos T e NK leva à fosforilação de DAP-10, que é uma proteína adaptadora de membrana e transdutora de sinais para ativação celular e desencadeamento do processo de lise celular (Pardoll et al., 2001). A expressão de MICA é induzida em situação de estresse, em diversos tipos de células epiteliais, resposta esta que pode ser fundamental para eliminar uma variedade de células sob esta condição, como acontece em infecções virais, processos tumorais e na auto-imunidade, como parte da resposta inata (Groh et al., 1999). De fato, já foi identificada a expressão de MICA nestas situações (Zwirner et al., 1999, Groh et al., 1999, Dimasi et al., 2004). O gene *MICA* presente na região do CPH de classe I é altamente polimórfico. Está em posição centromérica em relação ao gene HLA-B, encontra-se apenas a 64 kb de distância. Esse gene codifica moléculas que estão também implicadas em reações auto-imunes, como na colite ulcerativa, onde diferentes alelos têm sido envolvidos na predisposição e no fenótipo clínico da doença (Ding et al., 2005).

1.8.3. Suscetibilidade genética a doenças auto-imunes

A suscetibilidade genética ou resistência a doenças auto-imunes tem sido avaliada em estudos de substituição de aminoácidos na fenda de ligação dos antígenos ao CPH, como observado no diabetes mellitus tipo 1 (IDDM), cuja predisposição genética foi mapeada nos alelos de HLA-DQB, que não apresentam ácido aspártico na posição 57 da proteína. Já na artrite reumatóide, uma determinada seqüência de aminoácidos, nas posições 67-74 do HLA-DRB1, leva à predisposição para a doença (Singal et al., 1999).

Outros genes do CPH podem também estar envolvidos, no início ou na modulação das doenças auto-imunes, já que há mais de 100 genes não-HLA expressos localizados nessa região, cuja função, em muitos casos, permanece incerta. Pode-se ainda supor que haja o envolvimento de genes adicionais, que estão localizados em outras regiões do genoma, e em especial, genes envolvidos no controle da resposta imune, tais como os de citocinas, quimiocinas e seus respectivos receptores (Cookson et al., 1999).

1.8.4. Suscetibilidade genética à HAI

Estudos realizados por nosso grupo, numa população de doentes de São Paulo, mostraram que na HAI-1 há uma associação com CPH de classe II, HLA – DR*13 e na HAI-2 com HLA-DR*7, e em ambas as formas há também uma associação secundária com HLA-DR*03(17) (Bittencourt et al., 1999). Goldberg et al. (2001) verificaram, nesta mesma população, que o

risco de pacientes com HAI-1, portadores do alelo HLA-DRB1*1301 tinham um risco relativo (RR) de desenvolverem a doença de 6,81. Em pacientes europeus e americanos, a suscetibilidade genética à HAI-1 está associada ao HLA-DR3, DR52 e DR4, no Japão ao HLA-DR4 e na Argentina ao HLA-DR4 e DR13. Recentemente, Djilali-Saiah et al., (2004) identificaram, em crianças européias e canadenses com HAI-2, uma suscetibilidade genética conferida pelo HLA-DR7, resultados estes que estão em concordância aos encontrados em nossos estudos. Apesar de vários trabalhos mostrarem a associação de HAI com a região HLA-DR, apenas uma minoria dos indivíduos portadores destes alelos desenvolve a doença. A forte associação da HAI com genes na região do CPH bastante comuns na nossa população (o alelo associado HLA-DRB1*1301 está presente em aproximadamente 20% da população controle), com uma fração etiológica muito alta, em torno de 70%, aliada à baixa incidência da doença na população, nos leva à questão da presença de genes adicionais de suscetibilidade, que, junto com o HLA-DRB1*1301, seriam responsáveis pela suscetibilidade genética observada. Em outras palavras, HLA-DRB1*1301, poderia ser, como descrito anteriormente, além de um fator por si, um marcador de outro gene na região cromossômica, ou mesmo fazendo parte de um haplótipo específico com mais de um gene envolvido na suscetibilidade.

A maioria da variabilidade genética codificada por diferentes alelos de HLA de classe II resulta de mudanças de aminoácidos na fenda de ligação a antígenos da molécula de CPH. Na HAI, por exemplo, estudos sobre variações nas seqüências de aminoácidos mostraram que 94% dos

pacientes caucasóides britânicos e norte-americanos, com HAI-1, carregam o conjunto de aminoácidos LLEQKR, que inclui a lisina (K) na posição 71 da cadeia de polipeptídeos do HLA-DRB1. Esses aminoácidos definem não só os pontos de ligação do peptídeo dentro da fenda do CPH de classe II, mas também os pontos de contato que permitem o reconhecimento pelos linfócitos CD4+, por meio de seu receptor de antígenos. Assim, mudanças em um único aminoácido podem afetar a complementaridade estérica e eletrostática entre a molécula de CPH de classe II, o peptídeo antigênico e o seu receptor (Czaja et al., 2002).

Esses conjuntos de aminoácidos compartilhados têm sido descritos por estudos em pacientes adultos na Europa, América do Norte, Japão, México e Argentina, indicando que os conjuntos de aminoácidos LLEQKR e LLEQRR codificam os padrões de suscetibilidade à HAI nessas populações (Vázquez-Garcia et al., 1998). O DRB1*1301, associado a HAI tipo 1, em crianças argentinas e em pacientes brasileiros, codifica aminoácidos diferentes (ILEDER) nessa região. Ainda, recentes achados apresentam como hipótese alternativa o dimorfismo valina/glicina na posição 86 do HLA-DRB1. Essa troca de aminoácido polar (glicina) por não-polar (valina) poderia ser central no reconhecimento do peptídeo “hepatogênico” e conseqüentemente o início do desenvolvimento da doença seria direcionado pela ligação com o antígeno, uma vez que os resíduos da molécula DRB1 têm papel crítico na apresentação do antígeno na CAA e na indução da resposta imune. Convém salientar que este dimorfismo na posição 86 distribui-se por praticamente todos alelos conhecidos de HLA-DRB1,

indicando que, se tem um papel, este não pode ser independente de outros polimorfismos específicos para os alelos associados à suscetibilidade para a HAI.

Bittencourt et al. (2003) avaliando o polimorfismo na posição 49 do gene do *CTLA4* não observou associação na HAI, nem em crianças, nem em pacientes adultos. É possível, que outros genes, todos eles polimórficos, que fazem parte deste agrupamento, como o próprio *CD28*, *ICOS* e *PD1*, sejam os responsáveis pela associação observada em outras populações.

Dentro da região de classe III do CPH, Bittencourt et al., (2001) estudando pacientes brasileiros com HAI, não encontrou associação com o polimorfismo do *TNFA* na região promotora do gene, posição -308, de modo diverso aos achados em populações caucasóides européias e americanas (Cookson et al., 1999; Czaja et al., 2002). Estes dados aparentemente conflitantes, sugerem que a variante polimórfica do *TNFA*, o alelo A, seja na verdade um marcador genético da região do CPH, e que, na verdade, outros polimorfismos nesse gene ou ainda em genes próximos podem estar envolvidos na suscetibilidade à doença.

1.9. Citocinas

As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, igual ou inferior a 30 kDa, secretadas pelos leucócitos e por uma variedade de outras células. As citocinas apresentam ações pleiotrópicas e redundantes. Assim, quando há alteração da quantidade secretada de uma citocina em particular,

raramente ocorre um efeito biológico dramático, pois diferentes citocinas apresentam ações semelhantes. As citocinas atuam por meio de uma rede bastante complexa, que envolve a interação com seus receptores de superfície celular, específicos, os quais apresentam alta afinidade pelo seu ligante. Ao efetuarem esta interação, as citocinas são capazes de desencadear ações biológicas de estímulo ou de repressão, com efeitos tanto no local próximo à da sua secreção quanto à distância de seu local de síntese. A sua atividade pode desencadear efeitos em cascata, ativando outros genes que induzem ou participam de processos como divisão celular, proliferação, diferenciação, migração ou apoptose das células envolvidas (Vilcek, 2003). Uma vez que as citocinas e seus receptores desempenham importantes funções de regulação na inflamação e na resposta imune, alterações na sua produção podem estar envolvidas nos processo auto-imunes (Vergani et al., 2008).

1.9.1. Citocinas envolvidas na produção de IgE: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13

Como citado anteriormente, uma das características da HAI é a presença de hipergamaglobulinemia, com aumento predominantemente de imunoglobulina G (IgG). Além da IgG, também observamos um aumento da imunoglobulina E (IgE) em cerca de 50% de nossos pacientes com HAI-1, sem nenhuma causa aparente, como a presença quadros alérgicos e/ou parasitários (Porta et al., 2004). A produção de IgE é regulada pelas citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13.

A IL-4 é a citocina mais importante na polarização das células Th0 em Th2 e atua principalmente na fase indutora da resposta imune predominantemente humoral. Este tipo de resposta confere imunidade protetora principalmente contra helmintos, mas também pode levar a manifestações atópicas caracterizadas pela presença de asma, eczema, rino-conjuntivite e um aumento de IgE no soro (Shirakawa et al., 2000). A IL-4 pode inibir imunidade celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF α e a molécula antiinflamatória IL-1Ra (Vannier et al., 1992). As citocinas IL-4 e IL-13 compartilham certas características funcionais, como a indução de células dendríticas e da síntese de imunoglobulinas pelas células B.

Apesar dos efeitos de IL-13 e IL-4 nos linfócitos B serem semelhantes, as suas ações não são idênticas. Os níveis de IgG4 e IgE produzidos pelas células B em resposta a IL-13 são geralmente menores que aqueles induzidos por IL-4. Como as células T são necessárias para a ativação, expansão clonal, diferenciação e regulação da mudança de isotipos nas células B, a ausência de um receptor funcional de IL-13 na superfície do linfócito T torna esta célula incapaz de ser ativada, fato este que pode explicar, parcialmente, as diferenças de concentração de IgG4 e IgE quando as células B são induzidas por IL-13 ou por IL-4 (Punnonen et al., 1993). Assim, entre estas duas citocinas, apenas IL-4 é capaz de controlar a diferenciação em Th2 e está envolvida na iniciação da resposta Th2, enquanto que IL-13 está relacionada com as funções efetoras deste tipo de resposta (Vladich et al., 2005).

O receptor de IL-4 é um complexo heterodimérico que inclui a cadeia IL-4Ra fundamental para a ligação de IL-4. A ligação de alta afinidade da IL-4 com IL-4R promove a dimerização da cadeia alfa com uma segunda cadeia polipeptídica que pode ser a cadeia gama de IL-2 (IL-2R?) ou a cadeia do receptor de IL-13 (IL-13Ra1). Por outro lado, o receptor de IL-13 é composto por uma sub-unidade de IL-4Ra em combinação com a sub-unidade de baixa afinidade IL-13Ra1 ou com a sub-unidade de alta afinidade IL-13Ra2. Pelo fato de utilizarem a mesma cadeia IL-4Ra como um dos componentes de seus receptores, ambas citocinas compartilham algumas vias de sinalização (Kelly-Welch et al., 2003).

A IL-5 é uma citocina hematopoiética produzida por células Th2 e mastócitos e juntamente com IL-3 e GM-CSF, é um potente mediador de resposta inflamatória pelas células mielóides. Sua função é estimular a diferenciação de linfócitos B, aumentar a secreção de imunoglobulinas e mediar a ativação de eosinófilos. Apesar de ser importante na hematopoiese, tem papel na inflamação, asma e imunidade a parasitas (Ovington et al., 1998). A IL-5 tem sido associada a diversas doenças alérgicas, incluindo rinite alérgica e asma, onde aparece em níveis elevados na circulação e em tecidos das vias aéreas. Estudos experimentais mostram que a IL-5 parece estimular a hiperresponsividade pulmonar associada à eosinofilia (Shen et al., 2003).

A IL-10 é uma citocina, conhecida como fator de inibidor de síntese de citocinas (CSIF) pró-inflamatórias como o IFN- γ e outras moléculas, tais como IL-2, IL-3, TNF α e GM-CSF. É capaz de regular a proliferação e

diferenciação de células B e apresenta atividades imunorregulatórias como o aumento da produção de IL-4 por células T. A IL-10 é produzida por várias células do sistema imune, incluindo células NK, macrófagos, células dendríticas (DC) e subpopulações de células T ativadas e células B. A IL-10 pode inibir a produção de citocinas por células Th2 e induzir a anergia dessas células, diretamente ou por meio da sua atividade sobre outras células imunes (DC e linfócitos Tr1) e, portanto, controlar processos alérgicos, como a asma, e a produção exacerbada de IgE. Mais ainda, a IL-10 tem papel modulador no câncer, levando à evasão imune por meio da inibição do antígeno associado a tumor (TAA) apresentado por células DC. As próprias células malignas também produzem IL-10, configurando também um mecanismo de escape da resposta imune contra os tumores (Mocellin et al., 2004).

O receptor de IL-10 consiste de 2 subunidades pertencentes à família do receptor de interferons. A subunidade de ligação (IL-10R1 ou IL-10Ra) liga-se a IL-10 com alta afinidade e é expressa pela maioria das células hematopoiéticas. Como o IFN γ R e o IFN $\alpha\beta$ R, o IL-10R utiliza uma subunidade acessória para sinalização, o IL-10R2 (ou IL-10R β). Essa molécula contribui muito pouco para a afinidade da ligação com a IL-10, mas é crucial para a transmissão de sinal através da membrana celular por meio proteína-quinases da família JAK. (Finbloom et al., 1995).

1.9.2. Genes das interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13

Codificam proteínas de efeitos pleiotrópicos e que são importantes sinalizadoras entre as células do sistema imune, também são candidatos relevantes nos estudos de auto-imunidade.

O gene *IL-13*, expresso em linfócitos T humanos ativados (Minty et al., 1993), está localizado em 5q31. Contém 4 éxons e 3 íntrons, num total de 3 kb. A região cromossômica 5q31 tem aproximadamente 3Mb e apresenta um agrupamento de diferentes genes que codificam fatores de crescimento e citocinas que participam na proliferação, diferenciação e ativação das células hematopoéticas e do sistema imune (Smirnov et al., 1995). Estão presentes, nesta região, além do gene *IL-13*, os genes *IL3*, *IL-4* e *IL-5* e o gene do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, CSF2). Smirnov et al. (1995) demonstraram que o gene *IL-13* está localizado a 5' do gene *IL-4*, distante apenas 12 kb do mesmo. O gene *IL-4*, assim como *IL-13*, apresenta 4 éxons e 3 íntrons com semelhanças ao gene *IL-13* na sua organização interna, e com sítios de ligação para fatores nucleares comuns a ambos. Estas características levaram à sugestão de que estes dois genes tenham surgido a partir de um evento único de duplicação, ao longo da evolução (Smirnov et al., 1995; Wills-Karp, 2000). Além disso, existe uma região reguladora entre os genes *IL-4* e *IL-13*, que controla de modo coordenado a expressão dos genes do agrupamento 5q31 (Grünig, et al., 2003). Os produtos gênicos de *IL-4* e *IL-13* interagem com a cadeia α do receptor de *IL-4*, cujo gene está localizado no cromossomo 16,

em 16p11.2-12.1 (Pritchard et al., 1991). A IL-13 interage com seu receptor específico constituído pela cadeia α 1 do receptor de IL-13 (IL-13Ra1) associada à cadeia α 2 (IL-13Ra2). As cadeias IL-13Ra1 e IL-13Ra2 são proteínas transmembranárias glicosiladas, de 70 e 65 kDa, respectivamente, cujos genes (*IL-13RA1* e *IL-13RA2*) estão localizados no braço longo do cromossomo X (Xq24) (Grünig et al., 2003). Diferentes polimorfismos nos genes dos receptores IL-4R e IL-13RA1 (para a IL-13RA2 não foi relatada variabilidade até o momento), bem como nos genes que codificam seus ligantes (IL-4 e IL-13), podem interferir na regulação destas interleucinas e contribuir para a manifestação de um fenótipo de doença (Shirakawa et al., 2000).

Polimorfismos no gene *IL-4*, na região promotora, posição -589 T/C, e 33T/C, parecem regular a atividade dessa citocina e os níveis de IgE (Basehore et al., 2004). Esses polimorfismos têm sido associados à asma, (Beghé et al., 2003), à malária grave (Verra et al., 2004) e à artrite reumatóide (Pawlik et al., 2005). Quanto à IL-13, um polimorfismo na posição 110 do éxon 4 do gene que codifica a IL-13, caracterizado pela troca de arginina (G) por glutamina (A), está associado ao aumento dos níveis de IgE, além de estar associado à asma brônquica (Graves et al., 2000; Heinzmann et al., 2000) e à artrite idiopática juvenil (Heinzmann et al., 2003).

O gene *IL-5* possui 4 éxons e está localizado próximo ao gene da IL-4, com o máximo de 310kb de diferença. Ele é expresso por eosinófilos e sua expressão é regulada por vários fatores de transcrição, incluindo GATA-3, que induz o desenvolvimento de células Th2 (Höfer et al., 2002).

Mutações na região promotora do gene da IL-5 parecem contribuir para a gravidade da asma (Hong et al., 2005)

Variantes dos genes localizados na região 5q31 estão relacionadas com atopia e com o aumento do nível de IgE no soro (Meyers et al., 1994), associados com asma (Noguchi et al., 1997), com diabetes tipo 1 (Bugawan et al., 2003) e com doença de Graves (Hiromatsu et al., 2005).

O gene *IL-10* em humanos possui 5 éxons e está localizado no cromossomo 1. Estudos em gêmeos mostram que aproximadamente 75% das diferenças individuais na produção de IL-10 são determinadas geneticamente (Reuss et al., 2002). Polimorfismos na região promotora do *locus* de *IL-10* parecem ter relevância funcional em várias doenças de natureza infecciosa (Moreno et al., 2004; Mangia et al., 2004), auto-imunes (Luomala et al., 2003) e em imunodeficiências adquiridas (Breen et al., 2002).

Como a IL-10 funciona por meio do seu receptor (IL-10R), a variação no gene do receptor pode também influenciar na suscetibilidade a doenças. Estudos de mapeamento genético usando camundongos sugerem que o gene *IL-10RA* pode estar relacionado com a suscetibilidade à doença de Crohn (Kozaiwa et al., 2003)

Podemos inferir que na HAI, os genes do CPH de classe II têm mostrado uma forte associação com a doença, variando o alelo de suscetibilidade de acordo com a população estudada. No entanto, esses genes sozinhos não são capazes de explicar o desenvolvimento da doença, pois muitos portadores do perfil considerado de risco não desenvolvem a

doença, e vice-versa, sugerindo que devam existir outros genes envolvidos no aparecimento da doença.

Os “loci” associados à suscetibilidade a diferentes doenças auto-imunes, clinicamente distintas, podem ser controlados por um grupo comum de genes. Assim, genes localizados no CPH, entre as classes III e I, têm sido associados a doenças auto-imunes, na busca de um possível haplótipo de suscetibilidade. Portanto, o estudo de polimorfismos em genes presentes no CPH, poderia identificar fatores adicionais de suscetibilidade à HAI, procurando definir não apenas genes individuais, mas haplótipos associados à doença.

Esses dados, aliados ao estudo de genes envolvidos na regulação da IgE, aumentada em parte dos pacientes, poderão auxiliar o entendimento da fisiopatologia da HAI e se constituem nos objetivos deste trabalho.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar genes presentes na região do CPH (*BAT1*, *NFKBIL-1*, *LTA*, *TNFA*, *MICA*, *HLA-B*) comparando pacientes com HAI e indivíduos saudáveis, visando identificar genes adicionais e haplótipos de suscetibilidade à doença.

2. Avaliar o polimorfismo de genes das interleucinas (e seus receptores) implicados na regulação dos níveis plasmáticos de IgE (IL-4, IL-10 e IL-13 e seus receptores), comparando pacientes com HAI (com níveis IgE altos e baixos) e indivíduos saudáveis, visando identificar genes adicionais de suscetibilidade à doença.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do Departamento de Pediatria (CPE) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 24 de março de 2005, tendo o protocolo recebido o número 010/05 para o grupo de estudo. Para as amostras do grupo-controle a aprovação da CAPPesq foi em 09 de agosto de 2002, com protocolo de número 560/00 (Apêndices).

3.2. Critérios de inclusão

Incluímos no estudo todos os pacientes, acompanhados na Unidade de Hepatologia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), que preencheram os critérios diagnósticos da HAI segundo os Critérios Internacionais de Hepatite Auto-imune (Alvarez et al., 1999) e que tiveram a presença de auto-anticorpos nas seguintes condições:

- títulos superiores a 1/80
- positividade confirmada para um dos dois tipos de hepatite

3.3 Casuística

Grupo de Estudo: analisamos 132 pacientes com idade entre 2 e 15 anos, com diagnóstico de HAI, segundo os critérios internacionais de hepatite auto-imune (Tabela 1), sendo 107 do tipo 1 e 25 do tipo 2

Os dados clínicos dos pacientes, bem como, idade e sexo dos mesmos, estão descritos nos Apêndices.

O consentimento informado para o armazenamento do material biológico passou a ser necessário após 1999, e todos os pacientes, cujo DNA foi extraído antes dessa data, assinaram-no após convocação dos mesmos, pois as amostras de sangue foram colhidas, por ocasião dos exames realizados para o diagnóstico da doença. Na ocasião do diagnóstico foram realizados os seguintes exames no Laboratório do ICr-HCFMUSP: enzimas hepáticas (AST, ALT, GGT, FA), bilirrubinas totais e frações, eletroforese de proteínas, coagulograma, sorologia para hepatites A, B, e C, HIV, CMV, EBV, dosagem de ceruloplasmina sérica, dosagem de alfa-1antitripsina, fator anti-núcleo, auto-anticorpos (anticorpos anti-músculo liso, anti-microsoma fígado-rim, anti-mitocôndria). A extração dos DNAs para a tipificação de HLA foram realizadas no Laboratório de Imunologia do InCor – HCFMUSP e as amostras armazenadas no mesmo Laboratório. Os resultados de *HLA-DRB1* estão nos Apêndices. O modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) está apresentado nos Apêndices.

Grupo controle: Foram utilizadas amostras de sangue de 227

indivíduos sadios, não relacionados, candidatos a doação de medula óssea provenientes da Divisão de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) com o objetivo de realização de exames de histocompatibilidade, como provas de seleção do pré-transplante. Os exames foram realizados no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração - InCor/Laboratório de Investigação Médica, LIM-19, tendo sido encaminhados 5mL de sangue total periférico em tubo contendo EDTA 25mM, para a extração de DNA. As amostras de DNA, após a realização dos testes de seleção, foram mantidas a -20°C para eventuais exames. A utilização dessas amostras de DNA foi realizada após consentimento informado.

3.4. Métodos

3.4.1. Extração de DNA

Extraímos o DNA genômico a partir de amostras colhidas em tubo contendo EDTA. As extrações foram realizadas pelo método que utiliza sais de brometo de tetrametilamônio (Bignon: Viña, 1995).

Inicialmente centrifugamos o sangue a 2.000g, em centrífuga Sorvall, por 10 minutos. A seguir, desprezamos o plasma e 1.000 μL da camada leucocitária cuidadosamente retirada, transferimos para 2 tubos de 2 mL (aproximadamente 500 μL em cada tubo) ao qual adicionamos igual volume

de tampão de lise, contendo DTAB 12% (brometo de dodeciltrimetilamônio). As soluções empregadas neste trabalho estão discriminadas nos Apêndices. Homogeneizamos os tubos e incubamos em banho-maria a 68°C por 5 minutos, a seguir acrescentamos dois volumes de clorofórmio e depois agitamos vigorosamente e colocamos para centrifugar. Após centrifugação por 2 minutos a 10.600g a camada superior (aquosa), onde estava o DNA, recuperamos e adicionamos dois volumes de CTAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio). Homogeneizamos essa mistura até a obtenção de um precipitado. Após nova centrifugação por 2 minutos a 10.600g, ressuspendemos o sedimento obtido em 300µL de NaCl 1,2M (cloreto de sódio) e re-precipitamos em 750µL de etanol absoluto. Após centrifugamos em mais 2 minutos a 13.000g e ressuspendemos o sedimento novamente em etanol 70%, para retirar o excesso de sal. A seguir nova centrifugação a 17.900g por 2 minutos. Desprezamos o sobrenadante e o DNA obtido dissolvemos em água ultra-pura autoclavada.

Depois da extração, quantificamos os ácidos nucleicos em espectrofotômetro (Beckman – DU70) e verificamos seu índice de pureza, idealmente próximo de 1,8. Esta determinação foi feita por meio da razão entre as medidas espectrofotométricas nos comprimentos de onda de 260 e 280nm.

Diluímos previamente o DNA utilizado para a quantificação em 1:50 em água Milli-Q e o DNA puro estocamos a -20°C até o momento do uso.

A concentração de DNA (µg/mL) calculamos pela seguinte equação:
[DNA] = leitura 260nm x 50 (1D.O) x 50 (fator diluição da amostra).

Obs.: Uma densidade ótica (D.O.) corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de DNA dupla fita.

Verificação da integridade do DNA

Verificamos previamente todas amostras de DNA quanto à presença de degradação. Para tanto, preparamos a seguinte solução para cada DNA e submetemos à eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1x, corado com brometo de etídio (0,5µg/mL): 1µg de DNA + 2µL de solução de azul de bromofenol (solução de corrida) + H₂O q.s.p. 10µL.

Visualizamos os DNAs após exposição do gel em luz-ultravioleta (UV) (Sistema Alpha Imager), fotografamos e imprimimos em papel termossensível para documentação e posterior análise.

As amostras de DNA que não estavam íntegras foram re-extraídas.

Re-extração de DNA

Re-extraímos os DNAs que não amplificaram em mais de uma PCR, segundo o método, que utiliza fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Innis et al., 1990).

Colocamos 500µL de DNA em um tubo tipo “Eppendorf”. As amostras, cujos volumes eram insuficientes, completamos com água para 500µL. Adicionamos 500µL da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1); os tubos agitados vigorosamente e colocamos para centrifugar.

Após centrifugação por 15 minutos a 960g, transferimos a camada superior (aquosa), onde estava o DNA, para outro tubo. Acrescentamos novamente 500µL da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugamos novamente as amostras por mais 15 minutos a 960g e transferimos a camada superior para outro tubo. Acrescentamos 50µL de acetato de sódio 3M e homogeneizamos por inversão. Acrescentamos 1mL de etanol absoluto em cada tubo e depois submetemos à centrifugação por 2 minutos a 15.300g. Desprezamos os sobrenadantes e acrescentamos 1 mL de etanol 70% em cada tubo. Centrifugamos novamente por 2 minutos a 15.300g e desprezamos o sobrenadante. O DNA que obtido dissolvemos em água ultra-pura autoclavada e armazenamos a -20°C até o momento do uso.

3.4.2. Identificação dos polimorfismos (SNPs) das citocinas

Todos os polimorfismos que estudamos foram do tipo SNP ("Single Nucleotide Polymorphism"), e podem ser identificados pelo método de PCR ("polymerase chain reaction"). A detecção de cada variante alélica pode ser realizada por diferentes métodos. Utilizamos a técnica de PCR-RFLP ("restriction fragment length polymorphism") e a técnica de PCR-SSP ("sequence-specific primers") para análise dos polimorfismos.

3.4.2.1. PCR–RFLP

Primeira etapa: reação de amplificação

Realizamos em tubos de 0,2 mL, num volume final de reação de 25 µl, contendo: 50 ng do DNA a ser testado, 2,5 µl de tampão 10x (GIBCO-BRL), 1,5 mM de MgCl₂ (GIBCO-BRL), exceto para os SNPs do gene *TNFR* nas posições +196 e +1466 onde foi utilizado 1,0 mM e no caso dos genes *IL-10*, posição -592 e *BAT-1*, posições -22 e -348, onde utilizamos 2,0 mM de MgCl₂; 50 µM de cada dNTP (GIBCO-BRL), 0,25 µM dos iniciadores, exceto para os SNPs do gene *TNFR*, posição -609, *IL-10*, posição -592, *IL-4*, posição -589 e *IL-13*, códon 110, onde utilizamos 0,5 µM e 0,2 unidades (U) de *Taq* DNA polimerase (LABTRADE). As condições de amplificação foram: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturação), 30 segundos na temperatura de hibridização específica para cada par de iniciadores (tabela 2), 30 segundos a 72°C (extensão) e finalmente 7 minutos a 72°C, exceto para o SNP do gene *IL-10* nas posições -2763 e -2849, que foram modificados para 15 ciclos a 65°C e 25 ciclos a 58°C de 30 segundos cada, na temperatura de hibridização.

As seqüências dos iniciadores, as temperaturas de hibridização, as enzimas de restrição, com as respectivas temperaturas de incubação, bem como as quantidades utilizadas e o tamanho dos produtos amplificados e dos fragmentos obtidos na digestão estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Sequências dos iniciadores utilizados, temperaturas de hibridização, enzimas de restrição e tamanho dos produtos de PCR, antes e após digestão enzimática

SNIPs	Iniciadores	T °C	Produto PCR pb	Enzima restrição / ^a	Qtida de. ER*	Produto digestão pb
TNFA - 238G/A	F - AGGCAATAGGTTTTGAGGGCC R - TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	59	200	<i>Alw I</i> /37°C	3U	20,180
TNFA -308G/A	F - AGGCAATAGGTTTTGAGGGCC R - TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	59	200	<i>Nco I</i> /37°C	4U	20, 180
LTA +80A/C LTA +252A/G	F - GAGAGACAGGAAGGGAACAGAG R - CCGTGCTTCGTGCTTTGACTA	62	240	<i>BseY I</i> /37°C <i>Nco I</i> /37°C	5U 3U	20, 220 20, 190
NFKBIL -1-63T/A	F - CACAGTTCACCTCCGTCCTCCAGC R - CCTGTGTTTAAGAAGCTCGG	62	120	<i>Pvu II</i> /37°C	2U	10, 80
BAT- 1 -22G/C BAT-1 I-348 C/T	F - CCTCAGGTACCTTCACTACC R - CAACAGCACGAAGGAGGGACAT	62	320 130	<i>Nla III</i> /37°C	3U	40, 280 40, 90
IL-5-+746C/T	F - TTCCTGCTGCTCATGAACAGAATACGT R - CATTTTGATGGCTTCAGTGACTCTTCC	64	120	<i>Rsa I</i> /37°C	3U	31, 89
IL-4-589C/T	F - GACCCA AACTAGGCCT CACCT R - TCCTCCTGGGGAAAGATAGA	60	203	<i>Ava II</i> /37°C	3U	20, 183
IL-4 -33C/T	F - CTCATTTTCCCTCGGTTTCAGC R - GAAGCAGTTGGGAGGTGAGA	60	126	<i>Mnl I</i> /37°C	3U	44, 82
IL-13 Arg110Gln	F - CTTCCGTGAGGACTGAATGAGACGGTC R - CAAATAATGATGCTTTTCAAAGTTTCAGTGGA	66	236	<i>Nla IV</i> /37°C	2U	74, 162
IL-10-592C/A	F - ATCCAAGACAACACTACTAA R - TAAATATCCTCAAAGTTCC	56	320	<i>Rsa II</i> /37°C	3U	40, 280
IL-10 -2763A/C IL-10-2849 A/G	F- TCTAGGAAATGGCTTGAGAT R - AATAGGGTTGAGGTTAGGATCTG	65 58	254 318	<i>Dde I</i> /37°C <i>Alw I</i> /37°C	5U 2,5U	48, 92, 114 63, 92, 163
IL-10 -3575A/T	F- GGTTCCTTCATTTGCAGC R - AACTGTGAGCTTCTTGAGG	62	220	<i>Apo I</i> /50°C	2,5U	60, 160
TNFR +36 A/G	F-GAGCCCAAATGGGGGAGTAGAAGG R-ACCAGGCCCGGGCAGGAGAG	66	183	<i>MspA1I</i> /37°C	3U	75, 108
TNFR +196 T/G	F-ACTCTCCTATCCTGCCTGCT R-TTCTGGAGTTGGCTGCGTGT	60	242	<i>Nla III</i> /37°C	4U	109, 133
TNFR +609 G/T	F-CGGACGCTTATCTATATCTC R-TTGTAAGTCCAGTCAAGCA	56	361	<i>HpyCH4I</i> II /37°C	3U	97, 263
TNFR +1466 A/G	F-GGATGAAGCCCAGTTAACCA R-CAGAGAGTCAGGGACTTGCC	60	301	<i>MspA1I</i> /37°C	3U	96, 205
IL-13RA1 1398	F-TCAGTGATGGAGATAATTTA R-TGAGCTGCCTGTTTATAAAT	45	130	<i>MseI</i> /37°C	5U	45, 85

^a = temperatura de incubação das enzimas de restrição; F= "forward" ; R="reverse" ; Gln = glutamina; Arg = arginina; T = temperatura; pb = pares de base; *ER = enzima de restrição

Segunda etapa: digestão do produto de PCR

Em placas de amplificação de 96 poços, foram colocamos 10 µL dos produtos de amplificação e acrescentamos 20 µL de uma mistura contendo a enzima de restrição no tampão 1x correspondente. No sítio de restrição de cada enzima, se houver reconhecimento da sequência de nucleotídeos pela enzima, ocorrerá a digestão do produto de PCR no local da sequência, formando fragmentos menores. Se houve troca de um nucleotídeo no sítio de reconhecimento da enzima, não haverá o reconhecimento pela enzima nem a digestão decorrente.

Terceira etapa: detecção dos polimorfismos

Identificamos os polimorfismos por eletroforese em gel de agarose (2 a 4%) em tampão TAE 0,5x (pH 8,0), exceto para os SNPs de *IL-10* posição -592 e do gene *BAT-1* nas posições -22 e -348, que identificamos em gel de poliacrilamida a 8% com corrida em tampão TBE 1x (pH 8,0), sendo que em ambos os tipos de gel foi acrescentamos 0,5 µg/mL de brometo de etídio no tampão de corrida. A imagem resultante em cada gel obtivemos por iluminação ultravioleta (UV) em um sistema Alphaimager, sendo documentada para posterior análise.

3.4.2.2. PCR SSP

1ª etapa: reação de amplificação

Realizamos as reações em tubos de 0,2 mL, num volume final de reação de 25 µl, contendo: 50 ng de DNA e uma mistura de reagentes contendo 2,5 µl de tampão 10x (GIBCO-BRL), 50 µM de cada dNTP (GIBCO-BRL), 0,2 U de *Taq* DNA polimerase (LABTRADE), 1,5 mM de cloreto de magnésio (GIBCO-BRL) e 0,25 µM de cada iniciador (INVITROGEN) (Tabela 2). Realizamos a reação de PCR em 2 etapas: inicialmente, a 95°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos: 95°C por 30 segundos, 30 segundos na 1ª temperatura de hibridização específica para cada par de iniciadores (tabela 3), 30 segundos a 72°C; posteriormente uma etapa com 25 ciclos: 95°C por 30 segundos, 30 segundos na 2ª temperatura de hibridização específica para cada par de iniciadores (Tabela 3), 30 segundos a 72°C e finalmente 7 minutos a 72°C, exceto para o SNP *IL-10R* no códon330, que foi feito com 40 ciclos: 95°C por 30 segundos, 30 segundos na temperatura de hibridização específica para cada par de iniciadores (tabela 3), 30 segundos a 72°C e finalmente 7 minutos a 72°C.

As seqüências dos iniciadores, as temperaturas de hibridização e os produtos amplificados estão listados na Tabela 4.

Tabela 4- Seqüência dos iniciadores, temperatura de hibridização e tamanho dos fragmentos dos produtos de PCR.

SNP	“iniciadores”	T °C	Produto PCR pb
IL-10 –1082 G/A	F- ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA F- CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG R- CAGTGCCAACTGAGAATTTGG (comum)	65/62	258
IL-10r S138S/R	F – TCAGCCCTCAAGTCTCATGGTATTC R – TTGCTTCATCTACAAGGGCTCTGG F – GCGGGGCGGCATGAATGACACATATGAA R - GCGGGGCGAAGTGAAGATGCC F- CCCTTCATCTTCATCAGCCAGCGT	65/62 62	300 300
IL-10r G330R	R- CTCAGGTAACCCTGGAATGCCACAG F - GCCGGGGGGGAGAACGTGGGAAACG R-GGGGGCGGGCCACAGGGGGCTCCCT		
IL-4r 50 A/G	F-GAAGCCCACACGTGTA F-GAAGCCCACACGTGTG R-TCGCTGGGCTTGAAGGAG (comum)	60/58	180
IL-4 - 3017G/T	F-TTGGGTGGACAAGTAGTTGGAGCT F-TTGGGTGGACAAGTAGTTGGAGCT R-ATGTCCCATCCTGCCCAGGATAG(comum)	61/58	180

r=receptor; S= serina; R= arginina; G=glicina

2ª etapa: detecção dos polimorfismos

Identificamos os polimorfismos por eletroforese em gel de agarose (2 a 4%) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TAE 1x (pH 8,0). A imagem resultante em cada gel obtivemos por iluminação ultravioleta (UV) no sistema Alphaimager, sendo fotografada para posterior análise.

3.4.2.3. Tipificação de *HLA-B* por PCR-SSO

Realizamos a tipificação do *HLA-B* por meio da técnica de PCR-SSO (reação de polimerização em cadeia utilizando oligonucleotídeos seqüência-específicos), de acordo com as especificações do fabricante. É considerado um método de média resolução, pois não permite, na maioria dos casos, a

definição de um alelo específico, mas sim de grupos de alelos, que correspondem, de modo geral, às especificidades sorológicas. Trata-se de um PCR-SSO reverso, pois apresenta os oligonucleotídeos imobilizados em membranas de nylon (fitas). Composta de três etapas, a primeira etapa constitui uma reação de amplificação (PCR) utilizando um par de iniciadores biotinilados específicos para o éxon 2 e um par para o éxon 3, isto é, há amplificação dos éxons, onde se localizam a maior parte dos polimorfismos do gene *HLA-B*. A segunda etapa é a de hibridização do produto de PCR, com sondas específicas para o alelo ou grupo de alelos, seguidas de revelação da fita.

Primeira etapa: reação de amplificação (PCR)

Realizamos em tubos de 0,2 mL, composta de: 15 µL de uma solução contendo 200 ng de DNA, 15 µL de MgCl₂ e 30 µL de "master-mix" contendo os iniciadores marcados com biotina, dNTPs, tampão e a enzima *Taq* DNA polimerase. A reação de PCR foi realizada em um termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf), num total de 35 ciclos constituídos de: 15 segundos a 95° C (desnaturação), 45 segundos a 60° C (hibridização do iniciador) e 15 segundos a 72° C (extensão), seguidos de 5 minutos a 72° C. Imediatamente após o término da reação de amplificação, adicionamos 60 µL de uma solução desnaturante (desnaturação química), para manter as fitas de DNA abertas e possibilitar a hibridização com as sondas específicas.

Segunda etapa: hibridização do produto de PCR

Preparamos todas as soluções para a reação de hibridização a partir de soluções-estoque fornecidas pelo fabricante. Para cada indivíduo utilizamos uma fita ("strip"), identificada com número do paciente e colocada, com auxílio de uma pinça, em bandejas plásticas que permitem a hibridização simultânea de oito fitas. Adicionamos um volume de 5 mL de solução de hibridização, previamente aquecido a 50°C, a cada fita. Adicionamos, imediatamente, 70µl do produto de PCR (já com a solução desnaturante) a cada fita identificada. Incubamos as bandejas em banho-maria a 50°C, por 30 minutos. Nesta etapa ocorre a ligação (hibridização) do produto amplificado e marcado com avidina com as sondas específicas aderidas às fitas, sendo que as condições de exigência de hibridização (50°C) asseguram a especificidade da reação.

Removemos a solução de hibridização então, e realizamos duas lavagens, uma com a solução de lavagem em temperatura ambiente e outra com solução de maior exigência, em banho-maria 50°C, por 15 minutos, sob agitação. Esta lavagem deve ser realizada para que todo o produto não ligado seja removido da fita.

Detecção da reação

Adicionamos após a incubação e remoção da solução de exigência, 5 mL da solução de conjugado (estreptoavidina/peroxidase): 16 µl de conjugado em 5 mL de solução de lavagem e incubamos novamente a temperatura ambiente, sob agitação. Nesta etapa ocorre a ligação do produto amplificado marcado com biotina, e fixado à fita, com a estreptoavidina presente no conjugado. Removida esta solução, lavamos as fitas por duas vezes, com água Milli-Q estéril, para eliminação do conjugado não ligado. Após a lavagem, incubamos por 10 minutos, a temperatura ambiente, com solução de citrato. Desprezamos essa solução e adicionamos 5 mL de uma solução de substrato (TMB, tetrametilbenzidina) para revelação por cor, etapa na qual as fitas mantidas sob agitação, protegidas da luz, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a reação do conjugado com o substrato para a enzima, formou-se um complexo de cor azul. Interrompemos a reação por lavagens com água Milli-Q estéril e mantivemos as fitas em solução de citrato até a interpretação do teste.

Com auxílio de um gabarito que é sobreposto à fita, composto da numeração e posição das sondas, registramos em folha de leitura específica as reações positivas identificadas por bandas azuis, para posterior análise e interpretação, por meio de um programa fornecido pelo fabricante. Convém notar que é possível fazer a análise sem este programa, no entanto, o grande número de variantes alélicas torna o processo lento e trabalhoso, além de haver adição de novos alelos identificados em nível mundial, de

modo praticamente contínuo.

3.4.2.4. PCR-SSP para o gene *MICA*

Para a reação de PCR utilizamos iniciadores para as regiões de polimorfismo do gene *MICA*, localizados nos éxons 2, 3 e 4. O protocolo utilizado foi desenvolvido no laboratório de Imunologia do InCor, por Marin et al. (2004) adaptado do descrito por Stephens et al. (1999): Esta é uma reação com 20 µL de volume final, onde em cada tipificação utilizamos 20 misturas de iniciadores contendo: 100 ng de DNA, tampão 1x, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, 0,08 µM dos iniciadores 5' (5' CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A 3') e 3' (5' ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG T 3') que amplificam o controle interno, baseado na seqüência conservada do gene do hormônio de crescimento humano (hGH) e 1µM de iniciadores específicos.

Realizamos o PCR-SSP em 2 etapas, 1º e 2º PCR. As seqüências dos iniciadores estão descritas nas Tabelas 5 e 6. As misturas de iniciadores 5' e 3' utilizadas, os alelos identificados, bem como o tamanho dos produtos de amplificação, estão descritos na Tabelas 7 e 8.

Tabela 5 – Identificação, localização e sequência dos iniciadores 5' para a detecção dos diferentes alelos do gene MICA

IDENTIFICAÇÃO	LOCALIZAÇÃO**	SEQUÊNCIA 5' - 3'
F 1	éxon 2 (21- 40)	TAACCTCACGGTGCTGTCCT
F 2	éxon 2 (21- 40)	CCTCACGGTGCTGTCCG
F 3	éxon 3 (498 - 517)	GGAACACGGCGATATCTAG
F 4	éxon 2 (90 - 107)	TCAGCCCTTCCTGCGCTA
F 5	éxon 3 (497 - 517)	AGGAACTACGGCGATATCTAA
F 7	éxon 2 (51 - 70)	TGTGCAGTCAGGGTTTCTCG
F 8	éxon 3 (504 - 523)	ACGGCGATATCTAGAATCCG
F 10	íntron1 (6838) éxon2 (17)	CAGAGCCCCACAGTCTTCC
F 11	éxon 3 (432 - 451)	TTTCTTGAAGGAAGATGCCG
F 14	éxon 3 (320 –340)	CCCAGCATTCTACTACGATA
F 18*	éxon 2 (50 - 70)	CTGTGCAGTCAGGGTTTCTCA
F 19*	éxon 2 (148 - 168)	GCAGAAGATGTCCTGGGAAAC
F 20*	íntron 2 (274) éxon3 (272)	GGCTTGCAATCCCTCCG
F 21*	éxon 3 (294 - 314)	CCATGAAGACAACAGCACCAA
F 22*	éxon 2 (59 - 77)	CAGGGTTTCTCGCTGAGGG
F 23*	éxon 3 (501-523)	ACTACGGCGATATCTAGAATCCA
F 24*	éxon 3 (432 - 451)	TTTCTTGAAGGAAGATGCCG
F 25*	éxon 3 (345 - 364)	GCTCTTCCTCTCCCAAACG
F 26*	éxon 2 (171 - 192)	GACATGGGACAGAGAGACCAGA
F 27*	éxon 4 (556 - 573)	GTGAATGTCACCCGCAGT

* Iniciadores suplementares selecionados

** Localização dos iniciadores relativa à posição 1 do códon 1 no éxon 2 ou para o íntron, baseado nas seqüências do IMGT/HLA Database

Tabela 6 – Identificação, localização e sequência dos iniciadores 3' para a detecção dos diferentes alelos do gene MICA

IDENTIFICAÇÃO	LOCALIZAÇÃO**	SEQUENCIA 5'-3'
R 1	éxon 3 (373 - 392)	TGGGGCATTGTCCATTCCCTT
R 2	éxon 3 (517 - 536)	CTCAGGACTACGCCGGATT
R 4	éxon 3 (542 - 559)	GGCCAGCGTCCGTACCTC
R 5	éxon 4 (752 - 770)	AACCTCTGCTCCTCTCCTC
R 6	éxon 3 (562 - 545)	CCTGTTCTCCTCAGGACTAT
R 7	éxon 3 (385 - 403)	CTCTGGAGGACTGGGGCAT
R 8	éxon 4 (638 - 655)	CCTGACGCCAGGTACAGTA
R 9	éxon 3 (364 - 382)	TCCATTCTCAGTCTCCAC
R 10	éxon 3 (504 - 523)	TGGATTCTAGATATCGCCGT
R 12	éxon 3 (467 - 487)	CTGCATGCATAGCGTGATAGA
R 13	éxon 3 (385 - 402)	TCTGGAGGACTGGGGCAC
R 14	éxon 3 (517 - 535)	TCAGGACTACGCCGGATT
R 16	éxon 4 (661 - 680)	GTGTCGTGGCTCAAAGATAG
R 17	éxon 3 (542 - 559)	GGCCAGCGTCCGTACCTG
R 20*	éxon 3 (336 - 355)	AGAGGAAGAGCTCCCCATCA
R 22*	éxon 4 (811) – íntron3 (6)	GCTCACCAGAGGGCACAGC
R 23	éxon 3 (504 - 523)	TGGATTCTAGATATCGCCGT
R 24*	éxon 3 (424 - 447)	ATCTTCCTCAAGAAATTCCTGAT
R 25*	éxon 3 (467 - 486)	TGCATGCATAGCGTGATAGC
R 26*	éxon 3 (370 - 389)	GGCACTGTCCATTCTCAGA
R 27*	éxon 4 (741 - 760)	CCTCTCCTCGGCAAATCCTA
R 28*	éxon 4 (623 - 642)	GCTCAGTGTGATATTCCAGGGAC
R 29*	éxon 4 (752 - 772)	TGAACCTCTGCTCCTCTCCTT
R 30*	éxon 4 (811) -íntron3 (5)	CTCACCAGAGGGCACAGG
R 31*	éxon 4 (644 - 660)	CCCATCCTGACGCCAGC
R 32*	éxon 4 (751 - 772)	TGAACCTCTGCTCCTCTCCTTC
R 34*	éxon 3 (467 - 488)	TCTGCATGCATAGCGTGATAGT

* Iniciadores suplementares selecionados

** Localização dos iniciadores relativa à posição 1 do códon 1 no éxon 2 ou para o íntron, baseado nas seqüências do IMGT/HLA Database

Tabela 7 – Misturas de iniciadores utilizadas na 1ª PCR, para a detecção dos diferentes alelos/grupo de alelo e o tamanho do produto de PCR obtido

MISTURA	COMPOSIÇÃO	ALELOS/GRUPO DE ALELOS MICA*	PRODUTO AMPLIFICADO (PB)
1	F18 + R1	001	617
2	F2 + R2	002, 011, 015, 017, 020, 023, 030, 034, 035, 041, 046, 047	777
3	F25 + R4	004, 044	215
4	F4 + R4	004, 032, 044	744
5	F5 + R5	005, 035, 037, 039, 042	861
6	F4 + R6	006	730
7	F1 + R2	001, 005, 007, 012, 018, 021, 025, 026, 029, 031, 037, 038, 039, 040, 042, 043, 045	780
8	F8 + R8	008, 027, (035), (037), (039), (042), 048	739
9	F4 + R9	004, 006, 009, 044, 049	568
10	F10 + R10	010	799
11	F11 + R22	011	979
12	F1 + R12	012, 021, 032	741
13	F2 + R13	013, 022, 044	653
14	F14 + R14	014	217
15	F14 + R2	015	218
16	F3 + R16	016	770
17	F20 + R7	017	148
18	F1 + R1	001, 031, 040	646
19	F27 + R29	00202, 00701, 026, 045	217
20	F25 + R17	006, 009	215
21	F23 + R8	010, 016, 019, 022, 033	747
22	F5 + R22	011, 030, 047	922
23	F1 + R10	004, 006, 009, 010, 016, 019, (032), 033, 049	777
24	F7 + R7	002, 007, 011, 014, 015, 017, 020, (022), 023, 026, 029, 030, 034, 035, 036, 037, 038, 039, 040, 041, 043, (044), 045, 046, 047	628

Os alelos entre parênteses podem ser detectados, apesar da presença de uma incompatibilidade com o iniciador

Tabela 8 – Misturas de iniciadores utilizados na 2ª PCR, para a detecção dos diferentes alelos/grupo de alelo e o tamanho do produto de PCR obtido

MISTURA	COMPOSIÇÃO	ALELOS/GRUPO DE ALELOS MICA*	PB PRODUTO AMPLIFICADO
25*	F26 + R34	001, 018	584
26	F3 + R29	004, 006, 009, 014, 024, 028, 036, 044	861
27	F25 + R10	004, 006, 009, 044, 049	179
28	F4 + R2	005, 025, 031, 032, 042	721
29	F4 + R20	00902	540
30	F11 + R2	011, 034	106
31	F26 + R12	012, 021	583
32	F19 + R12	021	615
33	F2 + R10	022, 036, 044	777
34	F10 + R7	025	404
35	F3 + R31	028, 013, 014, 036	751
36	F1 + R24	029	701
37	F24 + R22	030, 047	987
38	F4 + R1	031	581
39	F4 + R12	032	670
40	F4 + R26	033	574
41	F11 + R30	034	979
42	F5 + R8	035, 037, 039, 042	747
43**	F21 + R10	036	220
44	F5 + R21	005, 034, 035, 037, 038, 039, 042	751
45	F5 + R16	039	770
46	F7 + R1	040	611
47	F22 + R23	041, 047	609
48	F5 + R27	042	851
49	F7 + R25	043	710
50	F5 + R32	045	860
51	F5 + R28	046	733
52	F1 + R17	001, 005, 007, 008, 009, 010, 012, 016, 018, 019, 021, 024, 025, 026, 027, 028, 029, 031, 033, 037, 038, 039, 040, 042, 043, 045, 048, 049	813

* Temperatura de hibridização = 68°C

** Temperatura de hibridização = 63°C

Preparo da misturas de iniciadores

Como citado anteriormente, cada uma das misturas era composta de: tampão 1x, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada dNTP, 0,08 μM do iniciador 5' e 3' do controle interno, 1 μM de iniciadores específicos, de acordo com as descrições das Tabelas 5 e 6. Preparamos um volume final de 18 μL , distribuídos em tubos de 0,2 mL, devidamente identificados e armazenados em freezer $-20^\circ C$ até o momento do uso.

Preparamos cada lote de misturas para 100 tipificações sendo que todos os lotes foram testados, previamente, frente a amostras de DNA-controle, de linhagens celulares homozigotas padrão provenientes do banco de células homozigotas para o CPH sediado no CEPH (Centre d'Études du Polymorphisme Humaine)

A reação de PCR-SSP

No momento da reação, descongelamos as misturas e a cada uma das 20 misturas adicionamos 2 μL de uma nova mistura contendo: 100 ng do DNA alvo, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase e água milliQ para PCR, q.s.p. 20 μL .

Realizamos o PCR-SSP em duas etapas. O 1º PCR constituído de 24 reações detecta os alelos mais comuns e alguns grupos de alelos.

O 2º PCR é realizado a partir das reações positivas detectadas no 1º PCR, de forma a confirmar um alelo ou testar para alelos mais raros não

detectados na primeira etapa. Exceto duas misturas, todas as demais utilizamos em uma mesma temperatura de hibridização.

Realizamos a reação de PCR em um termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: um ciclo inicial de 95° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95° C por 20 segundos (desnaturação), 65° C por 50 segundos (hibridização dos iniciadores), 72° C por 30 segundos (extensão da fita), e, posteriormente, 4° C para manutenção das amostras.

Submetemos o produto de PCR obtido à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 90 minutos, a 120 V, em solução de TEA 1x. Visualizamos as bandas específicas de amplificação do gene MICA em luz ultravioleta (UV) e fotografamos para documentação e posterior análise.

A determinação da especificidade está baseada na presença do produto amplificado de tamanho específico que foi comparado a um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb). A presença do produto de 480 pb, gerado pela amplificação do controle interno funciona como controle positivo da reação.

3.5. Análise Estatística

Comparamos a frequência dos polimorfismos, de pacientes e de controles usando o teste χ^2 com a correção de Yates ou teste de probabilidade de Fisher, quando apropriado. Consideramos significantes

valores de $p = 0,05$. Nos estudos de correlação com os dados clínicos e laboratoriais aplicamos a análise multivariada.

Obtivemos as frequências alélicas por meio da fórmula: $f_{al} = n/2N$, onde as frequências, relativa e absoluta, dos alelos são representadas por f_{al} e n , respectivamente e o número de indivíduos da amostra é N .

Já as frequências genotípicas, obtivemos por contagem direta empregando-se o programa CONVERT 1.1 (Probst, 1998). Este programa é auxiliar para a utilização do programa ARLEQUIN, versão 3.0 (Excoffier, Laval, Scheneider, 2005), usado no cálculo das frequências haplotípicas e do desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados. Utilizando ainda o pacote estatístico ARLEQUIN, comparamos as frequências genotípicas obtidas com as esperadas segundo o teorema de Hardy-Weinberg, pelo método de Guo e Thompson (1992). Obtivemos as estimativas das frequências haplotípicas pelo método de máxima verossimilhança, utilizando-se o algoritmo EM (maximização da expectativa).

Realizamos a análise de desequilíbrio para os alelos pertencentes ao mesmo “locus” gênico ou ao mesmo cromossomo. O valor de desequilíbrio é obtido pela fórmula:

$$D_{ab} = P_{ab} - p_{ab} \text{ onde:}$$

- D_{ab} : valor do desequilíbrio de ligação
- P_{ab} : frequência estimada do haplótipo **ab**, na população analisada
- p_{ab} : frequência esperada do haplótipo **ab**, calculada com base na frequência observada do alelo (**a**) de um dado *locus* e da frequência observada do alelo (**b**) de um outro *locus*.

No entanto, um valor relativo do desequilíbrio de ligação (θ'_{ab}) é mais informativo do que aquele descrito na fórmula acima, pois o θ'_{ab} traz informação a respeito da magnitude do desequilíbrio de ligação em relação ao maior valor que ele poderia assumir, dadas as freqüências dos alelos em questão (Lewontin, 1964). Este valor relativo foi calculado pelo programa ARLEQUIN, por meio da fórmula:

$$\theta'_{ab} = \theta_{ab} / \theta_{ab, \text{máx}}$$

- onde o valor de $\theta_{ab, \text{máx}}$ pode ter um dos dois valores:
- $\max [p_a p_b, (1 - p_a)(1 - p_b)]$, se $\theta_{ab} < 0$ ou
- $\min [(1 - p_a)p_b, p_a (1 - p_b)]$, se $\theta_{ab} = 0$

Estimamos a significância estatística das diferenças das freqüências genotípicas, alélicas e haplotípicas observadas entre pacientes e controles, utilizando análise das tabelas de contingência 2x2. O valor de p foi determinado pelo teste Qui-quadrado (X^2) com correção de Yates, ou teste de probabilidade de Fisher quando apropriado (n em alguma casela = 5). Adotamos valores de $p = 0,05$ como limiar de significância para todos os testes estatísticos realizados.

No cálculo da RC (Razão de Chances) a utilizamos a fórmula $OR = (A \times D) / (B \times C)$ (Woolf, 1955), sendo A, B, C e D as freqüências absolutas de indivíduos obtidas de uma tabela de contingência 2x2, como a seguir:

	Pacientes	controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

O valor de RC exprime quantas vezes a doença é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator comparado com indivíduos sem o fator. Valores de RC iguais a 1 indicam que o fator analisado não está associado ao caráter em questão; valores superiores a 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a doença; e valores abaixo de 1 a uma menor probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)

As frequências genóticas de todos os genes estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto nas amostras dos pacientes com hepatite auto-imune como no grupo-controle.

4.2. Estudo dos genes presentes entre as classes I e II do CPH e receptores de TNF

4.2.1. Análise individual dos SNPs

Os resultados, das amostras de pacientes com hepatite auto-imune, foram comparados com os do grupo-controle. Inicialmente os pacientes foram analisados independentemente do tipo de hepatite (HAI) devido ao pequeno número de pacientes com hepatite auto-imune tipo 2 (HAI-2). Todas as análises foram aplicadas ao grupo completo de pacientes e também ao grupo portador apenas de HAI-1.

4.2.1.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa (*TNFA*)

Estudamos dois polimorfismos na posição -308 e -238, da região promotora do gene *TNFA*. Os pacientes com hepatite auto-imune (HAI), foram comparados com o grupo-controle e observamos diferenças estatisticamente significantes no gene *TNFA*, nas posições -308 ($p < 0,0001$)

e -238 ($p=0,0230$).

Quando estudamos apenas os pacientes com hepatite auto-imune tipo1 (HA11), observamos diferença estatisticamente significativa entre os pacientes e o grupo-controle, nas frequências, genotípica ($p=0,0005$) e alélica ($p=0,0063$), mas somente na posição -308. Essa diferença foi mantida após agruparmos os genótipos que contêm o alelo raro A (AA+AG vs GG, $p=0,0220$).

Na posição -238, observamos diferenças significantes entre os pacientes com HAI e o grupo-controle ($p=0,0260$). Não observamos diferenças significantes nas frequências genotípicas entre pacientes com HA11 e controle, mesmo após agrupar os genótipos que contêm o alelo raro. Já a frequência alélica mostrou diferença estatisticamente marginal entre os dois grupos ($p=0,0460$) (Tabela 9).

4.2.1.2. Linfotoxina Alfa (LTA)

Avaliamos dois polimorfismos, nas posições +80 e +252 do íntron 1 do gene da *LTA*. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípica e alélica entre pacientes e o grupo-controle no polimorfismo na posição +80. No entanto, o polimorfismo na posição +252 mostrou diferença significativa marginal ($p=0,0410$), na frequência genotípica quando agrupamos os genótipos que contêm o alelo G (AA vs AG+ GG) em pacientes com HA11 (Tabela 10).

4.2.1.3. “Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1” (*NFKBIL-1*)

Analizamos o polimorfismo na posição -63, da região promotora do gene *NFKBIL-1*. Não observamos diferença significativa entre os pacientes e o grupo-controle (Tabela 11).

Tabela 9 – Comparação entre as frequências (%) genótípicas e alélicas dos SNPs -308A/G e -238A/G do gene *TNFA* entre pacientes com HAI e controles

<i>TNF</i> -308					<i>p</i>	χ^2	RC [95% CI]
genótipo	AA	AG	GG	n			
HAI	1 (0,01)	42 (0,33)	84 (0,66)	127	<0,0001	16,09	
HAI-1	1 (0,01)	34(0,33)	67(0,66)	102	0,0005	15,26	
AA+AG					0,0003	13,21	2,668 [1,555-4,578]
CT	4 (0,02)	33 (0,15)	189 (0,83)	226			
Alelo	A	G		2n			
HAI-1	36 (0,18)	168 (0,82)		204	0,0016	9,979	2,148 [1,326-3,480]
CT	41 (0,09)	411 (0,91)		452			
<i>TNF</i> -238							
genótipo	AA	AG	GG	n			
HAI	1 (0,01)	17 (0,14)	100 (0,85)	118	0,0230	7,578	
HAI-1	1 (0,01)	11 (0,12)	83 (0,87)	95	0,4370	1,651	
AA+AG					0,2178	1,519	
CT	1 (0,004)	18 (0,06)	212 (0,93)	226			
Alelo	A	G		2n			
HAI-1	13 (0,07)	177 (0,93)		190	0,0460	3,982	2,140 [0,997-4,590]
CT	15 (0,03)	437 (0,97)		452			

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados; χ^2 =qui-quadrado; RC= razão de chances

Tabela 10 – Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs +80A/C e +252A/G do gene *LTA* entre pacientes com HAI e controles.

<i>LTA</i> + 80					p	χ^2	RC [95% CI]
genótipo	AA	AC	CC	n			
HAI	12 (0,09)	57 (0,45)	58 (0,46)	127	0,1940	3,280	
HAI-1	10 (0,10)	47 (0,46)	46 (0,44)	103	0,3130	2,323	
AA+AC					0,4952	0,4652	
ctl	35 (0,16)	95 (0,43)	89 (0,41)	219			
alelo	A	C		2n			
HAI-1	67 (0,33)	139 (0,67)		210	0,2044	1,610	
ctl	165 (0,38)	273 (0,63)		438			
<i>LTA</i> +252							
genótipo	AA	AG	GG	2n			
HAI	49 (0,38)	64 (0,49)	17 (,13)	130	0,2460	2,804	
HÁ-1	36 (0,35)	56 (0,53)	13 (0,12)	105	0,1123	4,190	
AG+GG					0,0410	4,176	1,470 [1,019-2,644]
ctl	104 (0,46)	99 (0,44)	22 (0,10)	225			
HAI	A	G		2n			
HAI-1	128 (0,61)	82 (0,39)		210	0,0665	3,368	
ctl	307 (0,68)	143 (0,32)		450			

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados; χ^2 =qui-quadrado; RC= razão de chances

Tabela 11 – Comparação entre as frequências (%) genotípica e alélica do SNP -63T/A do gene *NFKBIL* entre pacientes com HAI e controles

<i>NFKBIL</i>-1 -63					p	χ^2
Genótipo	AA	AT	TT	n		
HAI	16 (0,12)	61 (0,47)	53 (0,41)	130	0,6620	0,824
HAI-1	13 (0,12)	53 (0,51)	39 (0,37)	105	0,5150	1,327
AA+AT					0,4138	0,6679
Ctl	32(0,14)	97 (0,44)	93 (0,42)	222		
Alelo	A	T		2n		
HAI-1	79 (0,37)	136 (0,69)		210	0,9039	0,014
ctl	161 (0,36)	283 (0,64)		444		

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados χ^2 =qui-quadrado;

4.2.1.4. “HLA-B Associated Transcript 1” (*BAT-1*)

Estudamos dois polimorfismos, -348 e -22, da região promotora do gene *BAT1*. Não verificamos diferenças significantes entre as frequências dos pacientes e o grupo controle nos dois SNPs avaliados, nem após agruparmos os alelos raros (Tabela 12).

4.2.1.5. MHC class I chain-related A (*MICA*) e *HLA-B*

Avaliamos a frequência dos alelos do gene *MICA* e *HLA-B* em pacientes com HAI e no grupo controle. Não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos estudados. Os alelos dos genes *MICA* e *HLA-B* estão apresentados com os alelos de HLA-DR17(*DRB1*03*) e 13, envolvidos na susceptibilidade à HAI (Tabela 13).

4.2.1.6. Receptores de TNF

Avaliamos dois polimorfismos nas posições -609 e +36, respectivamente, nas regiões promotora e exônica do gene do receptor 1 de *TNF* (TNFR1) e dois polimorfismos nas posições +196 e +1466, na região intrônica do receptor 2 de *TNF* (TNFR2).

Não observamos diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com HAI e o grupo-controle em nenhum dos polimorfismos estudados nos receptor 1 e no receptor 2 (tabela 14).

Tabela 12 – Comparação entre as frequências (%) genóticas e alélicas dos SNPs – 348C/T e -22C/G do gene *BAT-1* entre pacientes com HAI e controles

<i>BAT-1</i> -348					<i>p</i>	χ^2
genótipo	CC	CT	TT	n		
HAI	84 (0,69)	33 (0,27)	4 (0,03)	121	0,9060	0,198
HAI 1	70 (0,71)	25 (0,26)	3 (0,03)	98	0,9282	0,1491
CT+TT					0,8547	0,0335
ctl	155 (0,72)	54 (0,25)	5 (0,03)	214		
alelo	C	T		2n		
HAI 1	165 (0,84)	31 (0,16)		196	0,7806	0,077
ctl	364 (0,85)	64 (0,15)		428		
<i>BAT-1</i> -22						
genótipo	CC	CG	GG	nl		
HAI	12 (0,10)	60 (,49)	50 (0,41)	122	0,4400	1,640
HAI 1	9 (0,09)	53 (0,54)	36 (0,37)	98	0,1730	3,508
CG+GG					0,1079	2,594
ctl	23 (0,11)	91 (0,43)	99 (0,46)	213		
alelo	C	G		2n		
HAI 1	71 (0,36)	125 (0,63)		196	0,3182	0,997
ctl	137 (0,32)	289 (0,69)		426		

ctl=controle; χ^2 =qui-quadrado; n=número de indivíduos analisados

Tabela13 – Alelos do gene *MICA* e *HLA-B* em pacientes com HAI-1, distribuídos em *HLA-DRB1*03(17)* e *HLA-DRB1*13*, envolvidos na susceptibilidade à HAI em nossa população

<i>HLA-DR17</i>				<i>HLA-DR*13</i>			
*HAI-1 (n=16)		**ctl (n=22)		*HAI-1 (n=50)		**ctl (n=27)	
<i>MICA</i> n	<i>HLA-B</i> n	<i>MICA</i> n	<i>HLA-B</i> n	<i>MICA</i> n	<i>HLA-B</i> n	<i>MICA</i> n	<i>HLA-B</i> n
08 16	7 2 8 12 37 1 40 1 44 1	08 19	8 9 13 2 37 1 44 3 63 2 71 2 81 1	08 34	7 4 8 4 13 2 15 1 37 2 40 8 44 8 47 1 51 1 63 1 71 2	08 15	7 1 8 3 40 3 44 6 63 2
02 4	35 2 39 1 58 1	02 2	35 2	02 18	35 1 38 1 39 1 53 2 57 1 58 1	02 11	35 1 38 1 39 1 53 6 57 1 58 1
04 3	41 1 44 1 52 1	04 7	41 3 44 4	04 12	41 2 44 5 49 4 52 1	04 10	41 1 44 2 49 4 51 1 52 1 57 1
09 1	51 1	09 4	35 1 51 3	09 10	35 1 40 1 45 2 51 6	09 6	35 1 50 3 51 2
		16 3	35 3			16 1	35 11
06 1	51 1			6 1	51 1		
07 1	27 1			7 4	27 4		
01 2	18 2	01 4	18 4	01 3	18 3		
		10 3	62 3	10 5	62 5	10 3	62 3
11 2	65 2	11 2	65 2	11 2	35 1 65 1		
				12 1	56 1	12 1	55 1
				15 2	45 2	15 3	45 3
						17 1	57 1
18 1	18 1	18 1	71 1	18 1	53 1	18 4	53 4
19 1	64 1	19 1	71 1	19 4	64 1 71 3	19 1	64 1
						43 1	82 1

n = nº de indivíduos com cada alelo; ctl = controles; * total de pacientes c/ HAI-1 = 77; ** total de controles = 138

Tabela 14 - Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs do gene *TNFR1* (-609 e +36) e *TNFR2* (+196 e +1466) entre pacientes com HAI e controles

<i>TNFR</i> -609					χ^2	
					p	
genótipo	GG	GT	TT	n		
HAI	39 (0,38)	54 (0,53)	9 (0,09)	102	0,6950	0,75
HAI 1	33 (0,40)	43 (0,52)	7 (0,08)	83	0,7003	0,71
TT+GT					0,9435	0,05
Ctl	42 (0,39)	52 (0,49)	13 (0,12)	107		
Alelo	G	T		2n		
HAI-1	109 (0,66)	57 (0,34)		166	0,6697	0,18
Ctl	136 (0,64)	78 (0,36)		214		
<i>TNFR</i> +36					χ^2	
					p	
genótipo	AA (%)	AG (%)	GG(%)	n		
HAI	54 (0,47)	50 (0,44)	10 (0,09)	104	0,0260	7,27
HAI 1	45 (0,48)	40 (0,43)	8 (0,09)	93	0,1495	3,80
AG+GG					0,0678	3,33
Ctl	145 (0,61)	78 (0,33)	21(0,09)	244		
Alelo	G	A		2n		
HAI 1	56 (0,30)	130 (0,70)		186	0,1449	2,12
Ctl	120 (0,25)	368 (0,75)		488		
<i>TNFR</i> +196						
genótipo	GG	GT	TT	n		
HAI	12 (0,13)	53 (0,58)	26 (0,29)	91	0,1700	3,539
HAI 1	11 (0,15)	41 (0,56)	21 (0,29)	73	0,1609	3,654
GG+GT					0,1223	2,388
ctl	12 (0,08)	74 (0,52)	56 (0,39)	142		
Alelo	G	T		2n		
HAI 1	63 (0,43)	83 (0,56)		146	0,0795	3,076
clt	98 (0,35)	186 (0,65)		284		
<i>TNFR</i> +1466						
genótipo	AA	AG	GG	n		
HAI	32 (0,34)	41 (0,43)	22 (0,23)	95	0,7150	0,672
HAI-1	26 (0,35)	33 (0,45)	15 (0,20)	74	0,4832	1,455
AG+GG					0,4280	0,6284
Ctl	39 (0,30)	56 (0,43)	36 (0,27)	131		
Alelo	A	G		2n		
HAI-1	85 (0,57)	63 (0,43)		148	0,2203	1,502
Ctl	134 (0,51)	128 (0,29)		262		

ctl=controle; χ^2 =qui-quadrado; n=número de indivíduos analisados

4.2.2. Análise dos haplótipos

Foram comparados os haplótipos formados pelos genes presentes no CPH: *HLA-DRB1*, *TNFA*, *LTA*, *NFKBIL1*, *BAT1*, *MICA* e *HLA-B*. Observamos os haplótipos que contêm os genes *HLA-DRB1*, *MICA*, *HLA-B* e os SNPs *TNFA-308*, *TNFA-238*, *LTA+252*, *LTA+80*, *NFKBIL1-63*, *BAT1-22* e *BAT1-348*, presentes entre *HLA-DRB1* e *MICA*. As frequências dos alelos do gene *HLA-DRB1* incluído nesta análise estão em anexo (Anexo A)

Estimamos o Desequilíbrio de Ligação (LD) entre pares de alelos dos genes estudados na região do CPH, contidos entre o HLA-DR e o gene HLA-B. Observamos forte LD entre genes muito próximos, entretanto com alguns alelos raros não foi possível observar LD. Os LD mostraram diferentes níveis de significância (avaliado pelo D'). Valores são menores quanto mais afastados dos alelos do gene *HLA-DRB1* (Anexo B).

4.2.2.1 Haplótipo estendido do CPH, entre as classes II e I

Observamos 140 haplótipos diferentes nos pacientes HAI-1. O haplótipo ancestral 8.1, *HLA-DRB1*03*, *TNFA-238G*, *TNFA-308A*, *LTA+252G*, *LTA+80A*, *NFKBIL1-63A*, *BAT1-348C*, *BAT1-22C*, *MICA*08*, *HLA-B*08* foi mais comum nos pacientes com HAI-1 que nos controles (39,0 vs 9,0%, $p=0,0067$). O restante dos pacientes positivos para *DR17* (*HLA-DRB1*03*) exibiu diferentes haplótipos, inclusive carregando diferentes alelos de *MICA*. Já os pacientes que carregavam *DRB1*13* apresentaram mais de

40 haplótipos diferentes. Alguns desses haplótipos tinham freqüências entre 4 e 7% nos pacientes com HAI-1 mas estavam completamente ausentes no grupo-controle (Tabela 15).

Tabela 15 – Comparação das freqüências haplótipicas (%) dos genes, *HLA-DRB1*, *TNFA*-238, *TNFA*-308, *LTA*+252, *LTA*+80, *NFKBIL1*-63, *BAT1*-348, *BAT1*-22, *MICA* e *HLA-B* entre pacientes com HAI-1 e controles

<i>HLA-DRB1</i>	<i>TNFA</i> -238	<i>TNFA</i> -308	<i>LTA</i> +252	<i>LTA</i> +80	<i>NFKBIL1</i> -63	<i>BAT1</i> -348	<i>BAT1</i> -22	<i>MICA</i>	<i>HLA-B</i>	HAI-1 2n=152	Ctl 2n=256	<i>p</i>
*13	G	G	A	A	T	C	G	10	62	0,04	0,00	
	G	G	A	A	T	C	G	08	73	0,04	0,00	
	G	G	A	A	T	C	G	04	44	0,05	0,00	
	G	G	A	C	T	C	G	08	63	0,06	0,00	
	G	G	A	C	T	C	G	01	18	0,04	0,00	
	G	G	A	C	T	C	G	09	45	0,04	0,00	
	G	G	A	C	A	C	G	09	51	0,06	0,00	
	G	G	G	C	A	C	C	08	44	0,07	0,00	
	G	G	G	C	A	C	C	07	27	0,04	0,00	
	G	A	G	C	A	C	C	08	44	0,05	0,00	
DRB1*17												
*17	A	G	A	C	T	C	G	01	18	0,00	0,09	
	G	G	G	C	A	C	C	08	08	0,04	0,09	
	G	A	G	C	A	C	C	08	08	0,56	0,17	0,0041

ctl=controle

4.2.2.2. Haplótipos dos SNPs do CPH entre classes II e I

Foi feita também uma análise dos haplótipos incluindo apenas os SNPs de genes na região de classe III do CPH, ou seja: *TNFA*-238G/A, *TNFA*-308 G/A *LTA*+252A/G, *LTA*+80A/C, *NFKBIL1*-63T/A, *BAT1*-348C/T, *BAT1*-22C/G. Observamos 17 haplótipos diferentes, sendo que 6 foram mais comuns, com freqüência somada de mais de 80%. Desses, o haplótipo *TNFA*-238G, *TNFA*-308A, *LTA*+252G, *LTA*+80C, *NFKBIL1*-63A, *BAT1*-348C,

BAT1-22C, que contém os mesmos alelos do haplótipo ancestral, era mais comum nos pacientes com HAI-1 que no grupo controle (15 vs 7%, $p=0,0024$), e apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 16) sem aplicação da correção de Bonferroni para múltiplas análises.

Tabela 16 – Comparação das frequências haplotípicas (%) dos SNPs TNFA-238, TNFA-308, LTA+252, LTA+80, NFKBIL1-63, BAT1-348 e BAT1-22, presentes no CPH entre as classes II e I entre pacientes com HAI-1 e controles

<i>TNFA</i> -238	<i>TNFA</i> -308	<i>LTA</i> +252	<i>LTA</i> +80	<i>NFK</i> -63	<i>BAT1</i> -348	<i>BAT1</i> -22	<i>HAI-1</i> 2n=174	<i>Ctl</i> 2n=404	<i>p</i>	χ^2
G	G	A	C	T	C	G	40 (0,23)	92 (0,23)	0,9535	0,000
G	G	A	A	T	C	G	37 (0,21)	85 (0,21)	0,9516	0,003
G	G	G	C	A	C	C	28 (0,16)	85 (0,21)	0,1515	2,057
G	G	A	A	T	T	G	12 (0,07)	49 (0,12)	0,0604	3,527
G	A	G	C	A	C	C	26 (0,15)	28 (0,07)	0,0024	9,217
G	G	A	C	T	T	G	2 (0,01)	8 (0,02)	0,7308	Fisher

ctl=controle; χ^2 =qui-quadrado

4.2.3. Correlação com os níveis de IgE

4.2.3.1. Genes isolados

Os resultados mostraram associação entre níveis elevados de IgE e os alelos *13 e/ou*17 * do gene *HLADRB-1* ($p=0,0140$)(Tabela 17)

Tabela 17 – Comparação entre as frequências (%) dos alelos do gene HLA-DRB1 e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1

Genes	Níveis de IgE			<i>p</i>	χ^2
	alelos	normal	alto		
HLA-DRB1	*13 e 17	26 (0,74)	44 (0,94)	0,0140	6,001
	outros alelos	9 (0,26)	3 (0,06)		

χ^2 =qui-quadrado

4.2.3.2. Haplótipos

Os pacientes com HAI-1 e diferentes níveis de IgE apresentaram haplótipos diferentes. O haplótipo ancestral 8.1, *HLA-DR*03*, *TNFA-238G*, *TNFA-308A*, *LTA+252G*, *LTA+80*, *NFKBIL1-63A*, *BAT1-348C*, *BAT1-22C*, *HLA-B*08*, *MICA*08* foi mais comum nos pacientes com HAI-1 com IgE alta que nos com IgE normal (50 vs 33%, $p=0,6567$). O restante dos pacientes positivos para HLA-DR17 está distribuído em 3 haplótipos e perfazem 7% dos pacientes com HAI-1 que têm níveis de IgE elevados. Já os pacientes que carregavam *DRB1*13* apresentaram mais de 12 haplótipos diferentes e correspondem a 77% dos pacientes, distribuídos com diferentes alelos de MICA e HLA-B. Alguns desses haplótipos tinham freqüências entre 3 e 7% nos pacientes com HAI-1 e IgE elevados, mas estavam completamente ausentes no grupo com nível de IgE normal (Tabela 18).

Tabela 18 – Comparação entre as freqüências (%) haplotípicas dos genes HLA-DRB1, TNFA-238, TNFA-308, LTA+252, LTA+80, NFKBIL1-63, BAT1-348, BAT1-22, MICA e HLA-B presentes no CPH e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1

<i>HLA-DRB1</i>	<i>TNFA-238</i>	<i>TNFA-308</i>	<i>LTA+252</i>	<i>LTA+80</i>	<i>NFKBIL1-63</i>	<i>BAT1-348</i>	<i>BAT1-22</i>	<i>MICA</i>	<i>HLA-B</i>	HAI-1 IgE normal 2n=46	HAI-1 IgE alta 2n=70
*13	A	G	A	C	T	C	G	8	40	0,00	0,04
	G	G	A	A	T	C	G	10	15	0,00	0,04
	G	G	A	C	T	C	G	15	14	0,00	0,03
	G	G	A	C	T	C	G	2	57	0,00	0,03
	G	G	G	C	A	C	C	08	44	0,00	0,07
DRB1*17											
*17	G	A	G	C	A	C	C	08	08	n=6 0,33	n=12 0,50

4.3. Estudo dos polimorfismos nos genes das citocinas envolvidas na produção de IgE presentes no cromossomo 5 e de seus receptores

4.3.1. Análise individual dos genes

4.3.1.1. Interleucina 4 (*IL-4*)

Estudamos três polimorfismos no gene da *IL-4*, um na região promotora, posição -589, um na região intrônica posição +33 e um na região exônica, posição + 3017. Quando comparamos as frequências genóticas e alélicas, dos pacientes com HAI com o grupo-controle, observamos diferença estatisticamente significativa na frequência genotípica na posição +3017 do gene ($p=0,0080$).

Quando comparamos os pacientes com HAI-1 e o grupo controle, observamos, na posição +33, diferença estatisticamente significativa na frequência genotípica quando agrupamos os genótipos que contêm alelo T (TT+TC, $p=0,0439$). Já, na posição +3017, observamos diferença estatisticamente significativa na frequência genotípica ($p=0,0046$) entre pacientes com HAI-1 e o grupo controle (Tabela 19).

4.3.1.2. Interleucina 5 (*IL-5*)

Analizamos apenas um polimorfismo na posição -746, da região promotora do gene *IL-5*. Não observamos diferenças significantes entre pacientes e controle (Tabela 20).

Tabela 19 – Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos -589C/T, +33C/T e +3017G/T do gene *IL-4* entre pacientes com HAI e controles

<i>IL-4</i>					<i>p</i>	χ^2	RC [95% IC]
-589							
genótipo	TT	CT	CC	n			
HAI	18 (0,12)	39 (0,26)	91 (0,62)	148	0,0810	5,016	
HAI 1	18 (0,14)	33 (0,26)	75 (0,59)	126	0,0805	5,040	
TT+CT					0,0814	3,037	
Ctl	22 (0,12)	70 (0,38)	90 (0,50)	182			
alelo	T	C		2n			
HAI 1	69 (0,27)	183 (0,73)		252	0,2930	1,106	
Ctl	114 (0,31)	250 (0,69)		364			
<i>IL-4</i>							
33							
genótipo	TT	CT	CC	n			
HAI	20 (0,13)	38 (0,25)	93 (0,62)	151	0,1450	3,803	
HAI 1	20 (0,16)	28 (0,22)	80 (0,62)	128	0,0850	4,912	
TT+CT					0,0439	4,063	1,578 [1,011-2,463]
CT	30 (0,14)	77 (0,35)	113 (0,51)	220			
alelo	T	C		2n			
HAI 1	68 (0,27)	188 (0,73)		256	0,1003	2,701	
Ctl	143 (0,33)	297 (0,68)		440			
<i>IL-4</i>							
+3017							
genótipo	GG	GT	TT	n			
HAI	20 (0,20)	62 (0,56)	27 (0,24)	109	0,0080	9,739	
HAI 1	18 (0,20)	50 (0,55)	23 (0,26)	91	0,0046	10,75	
GG+GT					0,0105	13,97	0,549 [0,259-1,127]
ctl	15 (0,17)	58 (0,67)	13 (0,15)	86			
alelo	G	T		2n			
HAI 1	86 (0,47)	96 (0,53)		182	0,5312	0,3921	
ctl	88 (0,51)	84 (0,49)		172			

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados; χ^2 =qui-quadrado; RC= razão de chances

Tabela 20 – Comparação entre as frequências (%) genotípica e alélica do gene *IL-5* -746C/T entre pacientes com HAI e controles

<i>IL-5</i>					<i>p</i>	χ^2
-746						
genótipo	CC	CT	TT	n		
HAI	27 (0,22)	70 (0,56)	28 (0,22)	125	0,3230	2,261
HAI-1	20 (0,20)	57 (0,56)	24 (0,24)	101	0,5672	1,134
CC+CT					0,3822	0,7644
ctl	20 (0,17)	71 (0,55)	37 (0,28)	128		
alelo	C	T		2n		
HAI- 1	97 (0,48)	105 (0,52)		202	0,3022	1,064
ctl	111 (0,43)	146 (0,57)		256		

ctl=controle; χ^2 =qui-quadrado; ; n=número de indivíduos analisados

4.3.1.3. Interleucina 13 (*IL-13*)

Analizamos um polimorfismo no códon 110, do éxon 4 do gene da *IL-13*, onde há troca de arginina (alelo G) por uma glutamina (alelo A). Verificamos diferenças estatisticamente significantes, nas frequências genotípica ($p=0,0032$) e alélica ($p=0,0252$), entre os pacientes com HAI-1 e o grupo-controle (tabela 21).

Tabela 21 - Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNP Arg110Gln do gene da *IL-13* entre pacientes com HAI e controles

<i>IL-13</i> 110					p	χ^2	RC [95% IC]
Genótipo	AA (%)	AG (%)	GG (%)	n			
HAI	21 (0,15)	40 (0,29)	79 (0,56)	130			
HAI-1	18 (0,15)	37 (0,32)	63 (0,53)	118	0,0032	11,49	3,730 [1,373-10,13]
AA+AG					0,2774	1,180	
Ctl	6 (0,04)	60 (0,38)	94 (0,59)	160			
Alelo	A	G		2n			
HAI-1	73 (0,31)	163 (0,69)		236	0,0252	5,010	1,543 [1,054-2,250]
Ctl	72 (0,23)	248 (0,78)		320			

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados; χ^2 =qui-quadrado; RC= razão de chances

4.3.1.4. Receptor de IL-4 (*IL-4R*)

Avaliamos o polimorfismo no códon 50 do gene do receptor de IL-4, na região exônica do gene, onde há a troca de uma valina (alelo A) por uma isoleucina (alelo G) (Tabela 22). Foram analisados somente 85 pacientes e 85 controles, pois como foi o última PCR, a quantidade e qualidade dos DNAs não nos permitiu aumentar o n.

Tabela 22 - Comparação entre as frequências (%) genotípica e alélica dos SNPs do gene *IL-4R50* entre pacientes com HAI e controles

	IL-4R50				<i>p</i>	χ^2	RC [95% IC]
Genótipo	AA	AG	GG	n			
HAI	25 (0,29)	44 (0,52)	16 (0,19)	85	0,0056	10,37	
HAI-1	18 (0,26)	37 (0,54)	13 (0,19)	68	0,0026	7,287	
AG+GG					0,0194	5,46	2,77 [1,520 - 6,350]
ctl	10 (0,12)	63 (0,74)	12 (0,14)	85			
Alelo	A	G		2n			
HAI-1	73 (0,54)	63 (0,46)		136			
ctl	83 (0,49)	87 (0,51)		170			

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados; χ^2 =qui-quadrado; RC= razão de chances

4.3.1.5. Receptor de IL-13 (IL-13R)

Analizamos um polimorfismo na posição +1398, na região exônica do gene do receptor $\alpha 1$ da *IL-13*. Observamos diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com HAI-1 e o grupo-controle tanto na frequência genotípica ($p=0,0066$), mesmo após agruparmos os genótipos que contêm o alelo G (GG+AG) (0,0330) quanto na alélica ($p=0,0009$) (Tabela 23)

Tabela 23 - Comparação entre as frequências (%) genotípica e alélica do SNP do gene *IL-13RA +1398* entre pacientes com HAI e controles

	<i>IL-13RA +1398</i>				<i>p</i>	χ^2	RC [95% IC]
genótipo	AA	AG	GG	nl			
HAI	94 (0,72)	19 (0,14)	18 (0,14)	131	0,6830	0,762	
HAI-1	80 (0,72)	17 (0,15)	2 (0,02)	99	0,0066	10,03	
AG+GG					0,0182	5,580	2,21 [1,14-4,32]
ctl	57 (0,57)	16 (0,16)	12 (0,12)	100			
alelo	A	G		2n			
HAI-1	177 (0,89)	21 (0,11)		198	0,0009	11,05	2,59 [1,46-4,61]
ctl	130 (0,65)	40 (0,20)		200			

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados; χ^2 =qui-quadrado; RC= razão de chances

4.3.2. Análise dos haplótipos

Analizamos os haplótipos formados pelos SNPs *IL-5-746C/T*, *IL-13110Gln/Arg*, *IL-4-589*, *IL-4+33* e *IL-4+3017* dos genes presentes no cromossomo 5 envolvidos na regulação de IgE. Também estimamos o Desequilíbrio de Ligação (LD) entre esse SNPs. O polimorfismo *IL-5-746* estava em LD somente com a *IL-13110*. O demais SNPs *IL-13110* e *IL-4-589* e entre *IL-4-33* estavam todos em LD, mais forte entre *IL-4-589* e *IL-4+33* (Anexo C)

4.3.2.1. Haplótipos contendo os SNPs *IL-5-746C/T*, *IL-13110Gln/Arg*, *IL-4-589*, *IL-4+33*

Inicialmente, comparamos os haplótipos formados pelos polimorfismos dos SNPs *IL-5-746C/T*, *IL-13110Gln/Arg*, *IL-4-589*, *IL-4+33* entre os pacientes com HAI-1 e o grupo controle. Observamos 15 haplótipos diferentes, sendo que 5 apresentaram frequência maior que 10%. Desses, 3 apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com HAI-1 e o grupo controle. O haplótipo CGCC mostrou associação negativa com a HAI-1. Já os haplótipos TGCC e CACC mostraram associação positiva com a HAI-1 (RC= 2,196 e 5,963, respectivamente) (Tabela 24).

Tabela 24 – Comparação das frequências haplótípicas (%) dos SNPs *IL-5-746*, *IL-13110*, *IL-4-589* e *IL-433*, presentes no cromossomo 5q, entre pacientes com HAI-1 e controles

<i>IL-5-746</i>	<i>IL-13110</i>	<i>IL-4-589</i>	<i>IL-4+33</i>	HAI-1 2n=182	Ctl 2n=166	<i>p</i>	χ^2	RC [95%- IC]
C	G	C	C	42 (0,23)	55 (0,33)	0,0367	4,366	1,652 [1,029-2,650]
T	G	C	C	51 (0,28)	25 (0,15)	0,0035	8,945	2,196 [1,287-3,741]
T	G	T	T	16 (0,09)	18 (0,11)	0,4836	0,490	
C	A	T	T	18 (0,10)	10 (0,06)	0,1854	1,754	
C	A	C	C	18 (0,10)	3 (0,02)	0,0014	Fisher	5,963 [1,723-20,61]

ctl=controle, ; n=número de indivíduos analisados χ^2 =qui-quadrado; RC= razão de chances

4.3.3. Correlação com níveis de IgE

4.3.3.1. Genes isolados

Analizamos a correlação entre os níveis de IgE nos pacientes e os SNPs. Os resultados mostraram uma fraca associação entre níveis de IgE e o SNP *IL-4+33* ($p=0,0400$) (Tabela 25)

Tabela 25 – Comparação entre as frequências (%) do SNP *IL-4+33* e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1

Genes	alelos	Níveis de IgE		<i>P</i>	χ^2
		normal	alto		
IL-4 +33	CC	23 (0,70)	24 (0,50)	0,0400	6,425
	CT	3 (0,09)	16 (0,33)		
	TT	7 (0,21)	8 (0,17)		

χ^2 =qui-quadrado

4.3.3.2. Haplótipos

Comparamos os haplótipos formados no pacientes com HAI-1, de acordo com os níveis de IgE. Observamos 12 haplótipos diferentes, sendo que 5 tiveram frequência maior que 10%. Um desses haplótipos teve sua frequência estatisticamente diferente entre os níveis de IgE (Tabela 26)

Tabela 26 – Comparação entre as frequências (%) haplotípicas entre os SNPs *IL-5* -746T/C, *IL-13* 110 Arg/Gln, *IL-4* - 589C/T, *IL-4* +33 C/T, presentes no cromossomo 5 e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1

IL-5 -746	IL-13 110	IL-4 -589	IL-4 +33	HAI-1 IgE normal	HAI-1 IgE alta	<i>p</i>	χ ²	RC [IC 95%]
				2n=56	2n=88			
C	G	C	C	12 (0,21)	20 (0,23)	0,8550	0,033	
T	A	C	C	2 (0,03)	13 (0,15)	0,0475	Fisher	4,680 [1,014-21,60]
T	G	C	C	15 (0,27)	16 (0,18)	0,2207	1,500	
T	G	T	T	5 (0,09)	11 (0,12)	0,5943	Fisher	
C	A	C	C	7 (0,13)	4 (0,05)	0,1004		

χ² =qui-quadrado; RC= razão de chances

4.4. Estudo dos polimorfismos no gene das citocinas envolvidas na produção de IgE presentes no cromossomo 1 e de seus receptores

4.4.1. Análise individual dos SNPs

4.4.1.1. Interleucina 10 (*IL-10*)

Avaliamos cinco polimorfismos nas posições, -3575, -2849, -2763, -1082 e -592 da região promotora do gene *IL-10*. Não verificamos diferenças estatisticamente significantes nas frequências dos polimorfismos entre os

pacientes e controles, exceto na posição -2763 onde observamos diferença estatisticamente significativa na frequência genótipa ($p=0,0240$) entre pacientes com HAI e o grupo-controle. Quando comparamos os pacientes com HAI-1 e o grupo-controle, também observamos essa diferença ($p=0,0198$) (Tabela 27).

4.4.1.2. Receptor de IL-10 (IL-10R)

Estudamos dois polimorfismos, códon 138 e 330, na região exônica do gene do receptor *IL-10Ra1*. Comparando os pacientes com HAI e o grupo-controle observamos diferença estatisticamente significativa na frequência genotípica ($p=0,0080$) no códon 138 do receptor de *IL-10*. Tais diferenças também foram observadas na frequência genotípica ($p=0,0121$) e na frequência alélica entre HAI-1 e ($p=0,0061$) e o grupo-controle. Já, no códon 330, não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com HAI-1 e o grupo-controle (Tabela 29)

Tabela 27– Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs -592A/C, -1082A/G, -2763A/C, -2849A/G, -3575A/T do gene *IL-10* entre pacientes com HAI e controles

IL-10 -3575					<i>p</i>	χ^2
Genótipo	TT	AT	AA	n	0,1893	3,329
HAI	74 (0,58)	52 (0,41)	2 (0,02)	128	0,1130	4,362
HAI-1	57 (0,56)	42 (0,41)	2 (0,02)	101	0,1893	3,329
AA+AT					0,4942	0,4675
Ctl	134 (0,60)	77 (0,34)	13 (0,06)	224		
Alelo	T	A		2n		
HAI-1	156 (0,77)	46 (0,23)		202	0,9510	0,003
Ctl	345 (0,77)	103 (0,23)		448		
IL-10 -2849						
Genótipo	GG	AG	AA	nl		
HAI	76 (0,66)	38 (0,33)	1 (0,01)	115		
HAI-1	62 (0,67)	30 (0,32)	1 (0,01)	93	0,0732	5,229
AA+AG					0,3594	0,710
Ctl	160 (0,71)	52 (0,23)	12 (0,05)	224		
Alelo	G	A		2n		
HAI-1	154 (0,83)	32 (0,17)		186	0,9417	0,005
Ctl	372 (0,83)	76 (0,17)		448		
IL-10 -2763						
Genótipo	AA	AC	CC	nl		
HAI	3 (0,03)	47 (0,38)	73 (0,55)	113	0,0240	7,431
HAI-1	2 (0,02)	40 (0,41)	55 (0,57)	97	0,0198	7,041
AA+AC					0,5012	0,452
Ctl	21 (0,09)	67 (0,30)	136 (0,61)	224		
Alelo	A	C		2n		
HAI-1	42 (0,22)	150 (0,78)		194	0,5026	0,449
Ctl	109 (0,24)	339 (0,76)		448		
IL-10 -1082						
Genótipo	AA	AG	GG	nl		
HAI	59 (0,49)	48 (0,40)	13 (0,11)	120	0,7710	0,519
HAI-1	46 (0,48)	38 (0,40)	12 (0,12)	96	0,5379	1,240
AG+GG					0,7327	0,117
Ctl	112 (0,50)	93 (0,42)	19 (0,08)	224		
Alelo	A	G		2n		
HAI-1	130 (0,68)	62 (0,32)		192	0,4409	0,594
Ctl	317 (0,71)	131 (0,29)		448		
IL-10 -592						
genótipo	AA	AC	CC	n		
HAI	14 (0,11)	59 (0,48)	50 (0,41)	123	0,5520	1,185
HAI-1	12 (0,12)	48 (0,49)	38 (0,39)	98	0,5909	1,052
AA+AC					0,4942	0,467
Ctl	32 (0,14)	96 (0,43)	96 (0,43)	224		
Alelo	A	C		2n		
HAI-1	72 (0,37)	124 (0,63)		196	0,8040	0,061
Ctl	160 (0,36)	288 (0,64)		448		

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados; χ^2 =qui-quadrado;

Tabela 28 - Comparação entre as frequências (%) genotípicas e alélicas dos SNPs do receptor de IL -10, *IL-10R138* e *IL-10R330* entre pacientes com HAI e controles

IL-10r +138					<i>p</i>	χ^2	OR [IC95%]
Genótipo	S/S	S/G	G/G	Total			
HAI	82 (0,75)	19 (0,17)	9 (0,08)	110	0,0080	9,762	
HAI-1	68 (0,76)	13 (0,15)	8 (0,09)	89	0,0061	10,21	
SS+SG					0,0665	3,358	
Ctl	176 (0,83)	33 (0,16)	3 (0,01)	212			
Alelo	S	G					
HAI-1	149 (0,84)	29 (0,16)		178	0,0121	6,927	0,520 [0,310-0,874]
Ctl	385 (0,91)	39 (0,09)		424			
IL-10r +330							
Genótipo	R/R	G/R	G/G	Total			
HAI	13 (0,11)	44 (0,36)	67 (0,54)	124	0,1220	4,202	
HAI-1	10 (0,10)	31 (0,31)	58 (0,59)	99	0,2108	3,114	
RR+GR					0,6791	0,171	
Ctl	10 (0,05)	71 (0,34)	127 (0,61)	208			
Alelo	R	G					
HAI-1	51 (0,26)	147 (0,74)		198	0,2862	1,137	
Ctl	91 (0,22)	325 (0,78)		416			

ctl=controle; n=número de indivíduos analisados; r=receptor S= Serina; G=Glicina; R=Arginina χ^2 =qui-quadrado

4.4.2. Análise dos haplótipos

Analizamos os haplótipos formados por 5 SNPs da região promotora do *IL-10*. Obtivemos 20 haplótipos diferentes, sendo que apenas 4 desses tiveram suas frequências maiores que 10%. Em 2 desses 4 haplótipos mais frequentes, observamos diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com HAI-1 e o grupo-controle (Tabela 29).

Fizemos as estimativas do Desequilíbrio de Ligação (LD) entre os pares de SNPs estudados e observamos forte LD entre todos os pares (Anexo D)

Tabela 29 – Comparação das frequências haplótípicas (%) dos SNPs *IL-10-3573*, *IL-10-2849*, *IL-10-2763*, *IL-10-1082* e *IL-10-592*, presentes na região promotora do *IL-10*, entre pacientes com HAI-1 e controles

<i>IL-10</i> -3575	<i>IL-10</i> -2849	<i>IL-10</i> -2763	<i>IL-10</i> -1082	<i>IL-10</i> -592	CTL 2n=444	HAI-1 2n=180	<i>p</i>	χ^2	RC [IC 95%]
T	G	C	A	A	151 (0,34)	50 (0,28)	0,1313	2,277	
T	G	C	A	C	115 (0,26)	61 (0,34)	0,0445	4,036	1,466 [1,008-2,133]
T	G	C	G	C	44 (0,10)	2 (0,01)	<0,0001	Fisher	0,102 [0,024-0,426]
A	A	A	G	C	35 (0,08)	22 (0,12)	0,0883	2,906	

χ^2 =qui-quadrado; ; n=número de indivíduos analisados RC= razão de chances

4.4.3. Correlação com níveis de IgE

4.4.3.1. Análise individual dos SNPs

Analisamos a correlação entre os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1 e os SNPs estudados do gene da *IL-10*. Observamos um valor de significância estatística marginal no polimorfismo *IL-10-592* ($p=0,0510$) (Tabela 30).

Tabela 30 – Comparação entre as frequências (%) do SNP *IL-10-592* e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1

Genes	genótipo	Níveis de IgE		<i>p</i>	χ^2
		normal	alto		
IL-10 -592	AA	3 (0,10)	5 (0,11)	0,0510	3,81
	AC	20 (0,69)	22 (0,47)		
	CC	6 (0,21)	20 (0,42)		

χ^2 =qui-quadrado

4.4.3.2. Análise dos haplótipos

Analisamos a associação entre os haplótipos constituídos pelos SNPs do gene *IL-10* nos pacientes com HAI-1 de acordo com os níveis de IgE e observamos nos paciente com níveis de IgE elevados 16 haplótipos diferentes, dos quais 4 apresentaram frequência maior que 10%. O haplótipo TGCAA apresentou associação negativa com pacientes IgE elevada, assim como o haplótipo AAAGC. Porém, como o número de haplótipos obtido foi muito pequeno essa associação deve ser vista com cautela. Tivemos uma associação positiva (RC=2,256) com os níveis de IgE elevados com o haplótipo TGCAC, porém estatisticamente marginal ($p=0,415$). (Tabela 31)

Tabela 31– Comparação entre as frequências (%) haplotípicas entre os SNPs *IL-10-3573*, *IL-10-2849*, *IL-10-2763*, *IL-10 -1082* e *IL-10-592*, presentes na região promotora do *IL-10*, e os níveis de IgE dos pacientes com HAI-1

IL-10 -3575	IL-10 -2849	IL-10 -2763	IL-10 -1082	IL-10 -592	HAI-1 IgE normal 2n=50	HAI-1 IgE alta 2n=90	<i>p</i>	χ^2	RC [IC 95%]
T	G	C	A	A	22 (0,44)	20 (0,22)	0,0071	7,259	2,750 [1,302-5,808]
T	G	C	A	C	11 (0,22)	35 (0,39)	0,0415	4,156	2,256 [1,022-4,962]
T	G	C	G	C	3 (0,06)	3 (0,03)	0,1186	Fisher	
A	A	A	G	C	8 (0,16)	6 (0,07)	0,0005	10,98	5,525 [1,818-16,78]

χ^2 =qui-quadrado; ; n=número de indivíduos analisados; RC= razão de chances

5.DISSCUSSÃO

A hepatite auto-imune é uma doença complexa, multifatorial onde o componente genético tem grande influência, tendo o gene *HLA-DRB1* como principal fator envolvido na suscetibilidade. Este dado é confirmado também na população brasileira por Bittencourt et al. (1999) e Goldberg et al. (2001) que mostram haver uma forte associação do alelo *DRB1*13* com HAI-1 (RR=6,81). É importante salientar que estes alelos associados à HAI-1 são também comuns nos indivíduos sadios, sugerindo que genes adicionais possam estar envolvidos na suscetibilidade à doença.

Desta forma, para este estudo, foram selecionados genes de resposta imune presentes no CPH entre as regiões de classes II e I, *TNFA*, *LTA*, *NFKBIL1*, *BAT1* e *MICA*, e ainda *HLA-B* (HLA de classe I), que está apenas a 64 kb de *MICA*, para avaliar um possível envolvimento do polimorfismo genético destes genes, numa população infantil. Uma vez que o gene *HLA-DRB1* está fortemente associado à doença, ele poderia funcionar como um marcador genético na região podendo também, juntamente com outros genes, formar um haplótipo estendido envolvido na suscetibilidade à HAI.

Foi também efetuado estudo do polimorfismo nos genes que codificam as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, bem como no gene da IL-10; citocinas estas envolvidas na produção e regulação de IgE, uma classe de imunoglobulina que aparece aumentada nesses pacientes com HAI-1 sem nenhuma causa aparente. Esses genes poderiam também estar envolvidos na suscetibilidade à HAI-1, de forma isolada ou como um agrupamento gênico.

Neste estudo analisamos crianças, com idades de 1 a 15 anos, com hepatite auto-imune tipo 1 (n=105) e tipo 2 (n=25). Entretanto, discutiremos apenas os resultados obtidos na análise dos polimorfismos nos indivíduos com a hepatite auto-imune tipo 1, pois o número de pacientes com hepatite auto-imune tipo 2 não nos permitiria a realização de uma análise estatística adequada. Um resumo de todos os SNPs avaliados neste estudo está no Anexo E.

Os eventos que levam à injúria tecidual na HAI não estão totalmente elucidados, entretanto, verificamos no infiltrado inflamatório um predomínio de células T CD4+, que, ativadas, liberam citocinas que estimulam a expansão de células T citotóxicas e a produção de auto-anticorpos por linfócitos B, que participam da agressão aos hepatócitos. Citocinas pró-inflamatórias como o TNF participam deste processo. Assim, dentro da família do TNF, estudamos o polimorfismo dos genes *TNFA* (*TNFA*-308, *TNF*-238) e *LTA* (*LTA*+80, *LTA*+252).

Nosso estudo mostrou associação do polimorfismo na região promotora -308 do *TNFA* com HAI-1 em crianças, sendo que a frequência do alelo A apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com HAI-1 e o grupo controle. Essa mesma associação foi encontrada em dois estudos realizados simultaneamente, envolvendo pacientes adultos europeus (Cookson et al., 1999) e norte-americanos (Czaja et al., 1999). Quando examinamos em que haplótipos esta variante de TNF está presente, verificamos que, nos pacientes HAI este alelo se encontra majoritariamente no haplótipo ancestral 8.1, composto de DRB1*03(17), HLA-B*08 e

MICA*008, de modo muito diferente dos haplótipos encontrados no grupo controle. Assim, o alelo A de *TNFA* na posição -308 vincula-se na verdade, a um haplótipo de origem caucasóide, presente em número significativamente aumentado nos pacientes.

Estudo anterior a este realizado em nosso grupo (Bittencourt et al., 2001) com pacientes com faixa etária entre 4 e 69 anos, não mostrou associação deste alelo com a doença. A ausência de associação nesse estudo anterior pode ter sido devido à diferença na faixa etária da população analisada, uma vez que no presente estudo utilizamos apenas pacientes pediátricos, sugerindo que o alelo A possa ser importante para o aparecimento precoce da doença. Além disso, é possível que, como nosso estudo incluiu um maior número de indivíduos (102 vs 92 pacientes; 226 vs 83 controles) a significância estatística pôde ser alcançada.

A região promotora do gene *TNFA* está associada à regulação de diversos fatores de transcrição (NF- κ B/Rel, AP-1, AP-2, SP-1 e CREB) (Mycko et al., 1998). É importante salientar que esse polimorfismo na posição -308 do *TNFA*, referente à troca de uma base G por uma base A, está à 40 pb dos sítios de ligação com os fatores de transcrição AP-2 e ETs, podendo também, desta forma, afetar a transcrição do gene *TNF* (Messer et al., 1991). O alelo A já foi associado à maior produção de TNF (Kroeger et al., 1997). Entretanto, a correlação do polimorfismo *TNFA*-308A com altos níveis de transcrição é ainda controversa. Alguns estudos mostram que a produção do TNFa não é influenciada pelo polimorfismo *TNFA*-308 (Westendorp et al., 1997; Uglieri et al., 1998). Outros estudos concluem

que os genótipos do polimorfismo *TNFA*-308 influenciam doenças imunológicas (Field, 2001), enquanto outros sugerem que esse polimorfismo não exerce efeito funcional, mas aparece devido ao desequilíbrio de ligação com alelos HLA (Ugialoro et al., 1998). Os nossos dados que mostram uma vinculação forte do alelo A com o haplótipo ancestral 8.1 reforçam esta última hipótese.

Sem considerarmos a relevância do efeito funcional do *TNFA*-308, verificamos que esse polimorfismo está associado à suscetibilidade à HA11. Esse fato indica que também pode haver desequilíbrio de ligação deste gene com algum “locus” adjacente, o qual conteria a verdadeira variante de suscetibilidade.

Outro polimorfismo na região promotora do gene *TNFA*, o *TNFA* - 238G/A também foi incluído no nosso estudo. A variante A, bastante rara, está localizada em uma região reguladora, chamada “nuclear factor NF- κ B binding site” que parece influenciar a transcrição do gene (Hohler et al 1997) e a produção da citocina (Kaluza et al 2000). Esse polimorfismo está associado a diferentes doenças auto-imunes, dentre elas, a esclerose sistêmica (Tolusso et al., 2005) e artrite reumatóide (Fabris et al., 2002). Não observamos associação desse polimorfismo com a HA11. A frequência do alelo A mostrou, inicialmente, uma fraca associação com a doença, perdendo sua significância após a correção de Bonferroni, sugerindo a ausência de associação desse polimorfismo com a doença. Estudos sobre o papel do polimorfismo *TNFA*-238 na transcrição e produção do TNF α também têm mostrado resultados discordantes. Bayley et al., 2001

mostraram que presença do alelo A parece estar relacionada ao aumento da transcrição do gene. Huizinga et al (1997), demonstraram que células de indivíduos, que apresentam o genótipo AG, quando estimuladas com lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) produzem significativamente menos TNFa do que os indivíduos homozigotos para o alelo G, enquanto que Pociot et al (1995) não observaram tal diferença. Estudos têm mostrado associação desse polimorfismo *TNFA*-238 com outras doenças auto-imunes, como febre reumática (Ramasawmy et al., 2007) e doença de Graves (Simmonds et al., 2004). No entanto, é importante notar que essa variante encontra-se em baixa frequência, apenas em 3% no nosso grupo de controles.

A análise dos polimorfismos *LTA*+252 e *LTA*+80, presentes na região intrônica da *LTA*, foram incluídas no estudo. Há relatos sobre a associação desse polimorfismo com sarcoidose (Yamaguchi et al 2001), mas não observamos associação entre o polimorfismo *LTA*+252 e a HAI-1. A análise com os genótipos agrupados pelo alelo G (AG+GG) mostrou uma fraca associação que não se manteve após a correção de Bonferroni. O polimorfismo *LTA*+80 também não mostrou associação com a HAI-1. O alelo A já foi descrito como relacionado a menores níveis de produção da *LTA* (Knight et al., 2004). Ramasawmy et al (2007) encontraram associação entre esse polimorfismo e a cardiomiopatia chagásica crônica. Concordante com nossos dados, porém em estudo com a retinopatia diabética, Yoshioka et al (2006) também não mostraram associação desse polimorfismo. Assim, apesar da grande proximidade com o gene *TNFA*, a *LTA* por si, parece não contribuir com a suscetibilidade da HAI-1. De fato, já foi mostrado que a

produção mais alta de LTa está associada à presença da variante A na posição + 80, mas este efeito só é aparente nos linfócitos B, quando a transcrição é estimulada pelo fator ABF-1, que utiliza esta região como seu ponto de ancoramento (Knight et al., 2004).

O efeito biológico da citocina TNFa, bem como LTa, faz-se por sua ligação com os receptores TNFR1 e TNFR2, presentes na superfície celular (células do sistema imune e endotelial). Por este motivo, investigamos se os polimorfismos nesses receptores (*TNFR1*-609 e +36; *TNFR2* +196 e +1466) poderiam ter papel na suscetibilidade à doença.

Os polimorfismos *TNFR1*-609 e *TNFR1*+36 na região promotora e exônica, respectivamente, do gene *TNFR1* não mostraram associação com HAI-1. As conseqüências do polimorfismo na região promotora, -609, ainda não foram identificadas (Aggarwal et al., 1996). Porém, estudo mais recente mostra a associação negativa de ambos polimorfismos, -609 e +36, no gene *TNFR1* com a forma esporádica da artrite reumatóide (Barton et al., 2001). O efeito funcional do polimorfismo +36 parece estar relacionado com uma alteração na estabilidade do RNAm, modificando seu processamento e afetando a produção da proteína (Cartegni et al., 2002), uma vez que esse polimorfismo (A→G) implica numa troca sinônima (mesmo aminoácido, a prolina) e portanto sem um efeito funcional na própria molécula.

Os outros dois polimorfismos no gene *TNFR2*, *TNFR2*+196 e *TNFR2*+1466, incluídos neste estudo, também não mostraram associação com a hepatite auto-imune tipo 1 em nosso estudo.

O polimorfismo *TNFR2*+196 já foi descrito como associado com suscetibilidade a outras doenças auto-imunes, como a forma familiar da artrite reumatóide (Barton et al., 2001) e o lupus eritematoso sistêmico (Komata et al., 1999). O polimorfismo no *TNFR2*+1466 também é descrito como associado à suscetibilidade a doença de Crohn no Japão (Sashio et al., 2002), porém esta associação não foi observada em estudo com pacientes caucasóides (Washcke et al., 2005).

O efeito funcional desses dois polimorfismos no *TNFR2*, +196 e +1466, ainda não está estabelecido. Estudos mostram que o polimorfismo +196 leva à troca de um aminoácido, de uma metionina para uma arginina, numa região que codifica uma pequena porção da região transmembranária. Essa região contém o sítio de clivagem proteolítica que produz a forma solúvel do receptor 2, que apesar de parecer não afetar sua ligação com o TNFa., devido à sua localização, pode levar a uma alteração na conformação do receptor e inibir a ligação com TNFa. Experimentos com células HeLa mostraram aumento da produção IL-6 e da atividade de células T citotóxicas na presença do polimorfismo +196 (presença de arginina) em ensaios de transfecção em paciente com lupus eritematoso sistêmico (Morita et al., 2001)

Alguns estudos mostram associação de alguns desses polimorfismos dos receptores 1 e 2 de TNF com doenças, porém isso varia de acordo com a população. Nossos resultados sugerem que esses polimorfismos parecem não serem importantes na suscetibilidade à doença na população pediátrica estudada.

O polimorfismo na região promotora, posição -63 do *NFKBIL-1*, foi incluído no estudo, pois, apesar da função biológica da proteína ainda não ser conhecida, tem sido sugerida como um possível papel imunorregulador (Boodhoo et al., 2004). Não observamos associação desse polimorfismo com HAI-1 neste estudo. O alelo T foi o alelo mais comum em nossa população, aparecendo com altas frequências tanto nos pacientes com HAI-1 como nos controles (69 vs 64%). Esse alelo T tem sido associado ao desenvolvimento de artrite reumatóide (Okamoto et al., 2003).

Avaliamos também em nosso estudo dois polimorfismos no gene *BAT-1*, nas posições -22 e -348. Esses polimorfismos foram recentemente associados à cardiomiopatia chagásica crônica (Ramasawmy et al., 2006). Esses polimorfismos regulam negativamente a produção de citocinas inflamatórias (Allcock et al., 2001). Nossos resultados não mostraram associação entre esses polimorfismos e a HAI-1. Estudo de Price et al (2004) correlaciona os alelos -22G e -348T presentes no haplótipo ancestral 7.1 AH (*HLA-A3,B7, DR15*), a altos níveis da proteína em ensaios de transfecção. Estas variantes foram associadas com resistência a diabetes tipo 1, o que poderia ser explicado pelo aumento na transcrição do gene BAT. No entanto, este haplótipo não está associado à HAI-1. Por outro lado, as variantes -22C e -348C, de baixa produção, estão associadas ao haplótipo 8.1 AH (*HLA-A-1, B8,DR3*) que, como vimos, confere suscetibilidade a essa doença.

Nosso estudo mostrou que o alelo -22G, encontrado em maior frequência, é um alelo relacionado a altos níveis da proteína BAT, que como

consequência inibiria a produção de citocinas inflamatórias. Porém, esses alelos estiveram presentes tanto nos pacientes com HAI, como no grupo controle, sugerindo que esse polimorfismo não tem papel na suscetibilidade à HAI-1 em nossa população. Já alelo -348C, encontrado em maior frequência, é o alelo relacionado a níveis menores da proteína BAT, o que favoreceria a produção de citocinas inflamatórias. Assim, a menor modulação anti-inflamatória conferida pelo alelo -348C, apenas seria significativa quando presente no haplótipo 8.1 de suscetibilidade de parte dos pacientes HAI-1.

O gene *HLA-B*, situado numa região mais centromérica ao *HLA-DRB1*, foi incluído neste estudo pela sua proximidade com *MICA*. Além disso, a presença de células T CD8+ no infiltrado inflamatório do fígado sugere o envolvimento de moléculas HLA de classe I na doença. O gene *MICA*, com alto grau de equilíbrio de ligação com o gene *HLA-B*, também foi incluído neste estudo. Em doenças de natureza inflamatória, especialmente nas associadas com os alelos *HLA-B*, como no caso da doença de Behçet, da espondilite anquilosante e da uveíte tipo "birdshot", é possível que *MICA* seja o gene de suscetibilidade principal ou ainda funcione como um fator adicional, numa associação secundária. Porém, nossos resultados não mostraram associação dos genes *HLA-B* e *MICA* com a hepatite auto-imune em crianças. O alelo *HLA-B*08* foi o mais comum nas crianças com HAI-1, sempre associado ao alelo *MICA*008*, também o mais frequente nos pacientes com HAI-1. Esse alelo já foi descrito como o mais comum numa amostra de indivíduos saudáveis de São Paulo (Marin et al., 2004). Esses

dados são concordantes com estudos da distribuição do polimorfismo alélico deste gene em diversas outras populações (Petersdorf et al., 1999; Komatsu-Wakui et al., 1999; Zhang et al., 2001). A maioria dos pacientes com HAI-1 portadores do haplótipo HLA-B*08, MICA*008 eram positivos para HLA-DRB*03(17). Assim, essa observação pode ter sido simplesmente devido ao forte desequilíbrio de ligação encontrado entre *MICA* e *HLA-B* e a inclusão destes dois alelos no haplótipo ancestral 8.1 (Marin, 2002). Estudos de Grubic et al (2007) mostraram que o haplótipo HLA-DRB1*03,-B*08 está associado à sarcoidose pulmonar. Mais ainda, este mesmo haplótipo, comum no norte da Europa, está associado a doenças auto-imunes como diabetes do tipo 1, miastenia grave, lupus eritematoso sistêmico, doença celíaca (Kalil et al., 2004) e é, como já vimos, o principal haplótipo associado à HAI nas populações européias e americanas.

Já nos indivíduos que carregam *HLADRB1*13*, o alelo *MICA*008* apareceu ao lado de vários alelos de *HLA-B*, confirmando estudos de diversidade haplotípica (Tian et al., 2001). Os alelos mais comuns de *HLA-B* foram B-40 e B-44, porém não há estudos mostrando o envolvimento desses alelos com qualquer doença.

Em nossa população observamos diversos haplótipos com a presença de DRB*13. Alguns desses haplótipos apareceram apenas nos pacientes com HAI-1.

Foram identificados um total de 98 haplótipos nos pacientes com HAI, composto pelos genes do CPH aqui estudados. O único haplótipo fortemente representado nos pacientes, foi o haplótipo ancestral 8.1 (HLA-DRB1*03(17),

TNFA-238G, TNFA-308A, *LTA*+252G, *LTA*+80C, *NFKBIL*-1-63A, *BAT1*-348C, *BAT1*-22C, *MICA**008, *HLA-B**08). Além do mais, examinando apenas os indivíduos DRB1*13 e *03(17) verificamos que dos 83 haplótipos presentes no grupo, 25 carregavam *TNFA*-308A e, destes, 13 estavam inclusos no haplótipo ancestral 8.1. Já, nos controles, em 54 haplótipos observados (28 haplótipos DRB1*13 e 26 haplótipos DRB1*03 (17) apenas 11 carregavam o alelo *TNFA*-308A.

A proximidade entre os genes *TNFA* e *LTA* leva à presença de desequilíbrio de ligação importante entre eles. Assim, os dados obtidos na genotipagem dos SNPs de *LTA* refletem, na verdade, este fato. E é conhecido que o alelo raro *TNFA*-308A forma um haplótipo com *LTA*+80C e *LTA*+252G, os mais comuns para estas posições nos haplótipos observados. A contagem do alelo *LTA*+252A, associado à menor produção de LTa mostra que no grupo com HAI1, é justamente no grupo DR13 positivo que se encontra boa parte dos haplótipos positivos (34/64, 54%), enquanto que nos haplótipos DR13 positivos do grupo controle apenas 23% carregavam o alelo A. O inverso pôde ser observado nos haplótipos DRB1*03(17) positivos.

O haplótipo ancestral 8.1 também foi mais freqüente (50 vs. 33%) nos pacientes com níveis de IgE elevados porém não observamos diferenças estatisticamente significantes, provavelmente devido ao número restrito de haplótipos representados no grupo de pacientes. Por este motivo, o número de indivíduos DRB1*03 negativos no grupo de pacientes com IgE normal foi muito baixo.

Em conjunto, a análise dos polimorfismos nos genes mais afastados do "locus" *HLA-DRB1*, ou seja em *NFKBIL1*, *BAT1*, *HLA-B* e *MICA* parecem não ter papel na suscetibilidade à HAI-1, reforçando o papel do *HLA-DRB1* na doença, e sugerindo que apenas os genes mais próximos ao "locus" *HLA-DRB1*, como o *TNFA*, tenham um eventual papel adicional na suscetibilidade à HAI-1.

Com relação à investigação do polimorfismo genético em genes de citocinas envolvidas na produção de IgE, analisamos, inicialmente, três polimorfismos no gene *IL-4* (*IL-4* -589, *IL-4* +33 e *IL-4* +3017), que parecem regular a atividade dessa citocina e, possivelmente, os níveis de IgE.

Em nosso estudo, não observamos associação entre o polimorfismo *IL-4* -589 e a HAI-1. O alelo T foi observado numa frequência semelhante a do grupo controle (27 vs 31%), porém, o genótipo CC foi mais freqüente nos pacientes (62 vs 50%). Também não observamos associação desse polimorfismo com os níveis de IgE desses pacientes. Estudo de Nunez et al (2008) não mostrou associação do polimorfismo *IL-4* -589 com doenças auto-imunes, como o diabetes tipo 1 e a artrite reumatóide. Já Pawlik et al. (2005) encontram associação entre esse polimorfismo e a artrite reumatóide em pacientes poloneses, sendo que a presença do alelo T esteve significativamente aumentada de acordo com o grau de atividade da doença. O genótipo GG para o polimorfismo *IL-4* -589 já foi descrito como associado ao desenvolvimento de hipotireoidismo em pacientes norte-americanos com doença de Hashimoto (Nanba et al., 2008). Rosenwasser et al. (1995)

associaram esse polimorfismo com níveis elevados de IgE em indivíduos asmáticos americanos e japoneses. Esses resultados foram diferentes dos encontrados em estudos em famílias inglesas e australianas (Walley e Cookson 1996) e em populações árabes (Hijazi e Haider, 2000) que não encontram associação desses polimorfismos com os níveis de IgE.

Assim, esses dados mostram que a associação com esse polimorfismo pode variar em diferentes populações ou grupos raciais, e também conforme o tamanho amostral, já que a frequência do alelo mutado difere nos diferentes grupos étnicos.

O polimorfismo *IL-4* +33, associado com a atividade transcricional de *IL-4* (Kabesch et al., 2003), também foi avaliado neste estudo. Observamos em nossos pacientes uma associação marginal com HAI-1, observada somente quando agrupamos os genótipos que contêm o alelo T (TT, TC vs CC). Nossos resultados também mostraram uma fraca associação desse polimorfismo com os níveis mais altos de IgE dos pacientes com HAI-1. Entretanto, esta perdeu significância após aplicação da correção de Bonferroni. Estudo de Suzuki et al (2000) com pacientes japoneses asmáticos mostra que a presença do alelo T no polimorfismo *IL-4*+33 está associado com níveis elevados de IgE e não com a presença de asma. No caso das doenças alérgicas, a imunoglobulina E é antígeno-específica, mas na HAI-1, estudos feitos em nossos pacientes mostraram que a elevação dos níveis plasmáticos de IgE é inespecífica, ou seja, de natureza policlonal (dados não publicados). Assim, há duas possibilidades para explicar os nossos achados. Por um lado, é possível que o aumento da IgE inespecífica

deve-se a outros fatores não ligados à produção da IL-4. Por outro lado, é possível que esses polimorfismos, *IL-4-589* e *IL-4+33*, devam ser reavaliados com aumento do tamanho amostral, para confirmação se há ou não associação com a doença e/ou com os níveis de IgE encontrados nos pacientes com HAI-1. Uma vez que há forte desequilíbrio de ligação entre as variantes desses polimorfismos, é importante que eles sejam analisados em bloco podendo, em conjunto, ter um papel relevante na regulação de IgE.

Outro polimorfismo do gene *IL-4* associado ao aumento de IgE, avaliado neste estudo, foi o da posição +3017 (ítron 2). Observamos em nossos pacientes uma forte associação com esse polimorfismo ($p=0,0046$), porém, não foi observada associação com os níveis elevados de IgE nesses pacientes. Estudo de Basehore et al (2004) em pacientes asmáticos mostra haver uma associação do alelo T com aumento dos níveis de IgE, em um único estudo envolvendo pacientes norte-americanos, africanos e hispânicos. Já em pacientes asmáticos alemães (Kabesch et al., 2003) a mesma associação não foi identificada.

A associação do polimorfismo *IL-4 +3017* observada em nosso estudo sugere o envolvimento desse polimorfismo na suscetibilidade à HAI. Porém, não havia diferenças na frequência da variante T nos dois pacientes divididos conforme os níveis de IgE. Neste ponto, é preciso salientar que os níveis altos de IgE podem resultar da interação entre variantes altas produtoras de IgE de mais de um gene, e que portanto manifestar-se-iam apenas em parte dos pacientes, numa situação onde, além da variante T na

posição +3017 do gene *IL-4*, haveria outros polimorfismos que não foram analisados neste estudo.

Avaliamos neste estudo também o polimorfismo *IL-13+110* no gene *IL-13*, outra citocina com papel importante na regulação de IgE. Nossos resultados mostraram associação com HAI1 tendo sido observado uma maior frequência do alelo A, que acarreta uma alteração no código de leitura, produzindo uma sequência com glutamina ao invés de arginina. Modelo computacional mostra que na troca de arginina por glutamina, aminoácidos que apresentam cargas diferentes, há um aumento da afinidade de interação da citocina *IL-13* com seu receptor, o que resulta em aumento da secreção de muco, levando à asma (Heinzmann et al., 2000). Também foi descrito a associação da variante com glutamina com asma brônquica e dermatite atópica em 3 populações caucasóides pediátricas (Graves et al 2000). Neste trabalho, a presença da variante *110Gln* apresentou forte correlação com níveis elevados de IgE. Hoffjan et al (2004) também mostraram que esse polimorfismo está associado aos níveis aumentados de IgE, em crianças de 1 ano avaliadas num estudo de coorte, denominado “Childhood Origin of Asthma”. Esse mesmo polimorfismo *IL-13110A* já foi descrito em associação à artrite idiopática infantil (Heinzmann et al 2003). Porém, não observamos correlação desse polimorfismo com os níveis de IgE de nossos pacientes com HAI1. Resultado concordante com nosso foi observado em estudo de Celedon et al (2002) que também não observaram associação desse polimorfismo com os níveis de IgE em pacientes asmáticos costa-riquenhos. Diferentes fatores foram mencionados para explicar essa ausência de

associação, tais como, heterogeneidade étnica da população estudada e diferenças na interação dos genes envolvidas na manifestação do fenótipo asmático. Além disso, do mesmo modo que com IL-4, é possível que o fenótipo "nível aumentado de IgE" apareça apenas quando outros genes contribuem para o seu aparecimento. Assim, tanto no caso da IL-4 como no caso da IL-13, o nível aumentado de IgE pode ser visto como uma sentinela que indica o envolvimento destes genes na suscetibilidade à HAP1, extensivo a todos os pacientes e sem que a própria IgE tenha qualquer papel na patogenia da doença.

Como a função biológica das citocinas é mediada pela ligação com seus receptores, avaliamos neste estudo dois polimorfismos nos genes dos receptores de IL-4 e de IL-13, *IL-4R50* e *IL-13RA1+1398*, respectivamente.

A substituição de valina por isoleucina na posição 50 do gene *IL-4R* parece aumentar a sinalização para IL-4 em células B (Mitsuyasu et al., 1998). Pacientes japoneses com asma atópica mostram alta incidência dessa substituição, sugerindo que este polimorfismo possa estar envolvido no desenvolvimento de atopia nessa doença. Esse polimorfismo também tem sido associado a aumento da síntese de IgE em pacientes com atopia (Mitsuyasu et al., 1999). Entretanto, Prots et al (2006) mostram que a presença do aminoácido valina no polimorfismo *IL-4R50* está associada à erosão na artrite reumatóide avaliada em pacientes alemães.

Nosso estudo mostrou associação do polimorfismo *IL-4RA50* com hepatite auto-imune tipo 1 em nossos pacientes pediátricos. Porém, não verificamos a associação desse polimorfismo com aumento dos níveis de

IgE nesse pacientes. Apesar dos resultados obtidos, estes ainda são inconclusivos, principalmente quanto a sua influência nos níveis séricos de IgE. Pois como este foi um dos últimos polimorfismos a serem estudados, tivemos problemas técnicos, como amostras de DNA degradadas e volume insuficiente de amostra para realização da PCR.

O polimorfismo *IL-13RA1+1398* no gene do receptor de IL-13 avaliado neste estudo apresentou associação positiva com a HAI-1, com alta frequência do alelo A. Novamente, não observamos associação deste polimorfismo com os níveis de IgE nos pacientes com HAI-1. O papel funcional desse polimorfismo e de suas variantes ainda não está bem definido, havendo resultados contraditórios na literatura. Heinzmann et al (2000) mostram associação entre alelo A e o aumento de IgE em pacientes, enquanto que Kim et al (2006) mostram associação entre o alelo G associado ao aumento de IgE em crianças coreanas portadoras de asma atópica. Adicionalmente, neste último estudo, o aumento da IgE sérica mostrou ser fruto de interação gênica entre 3 variantes polimórficas no gene *IL-13*, que não foram abordadas em nosso trabalho, e de seu receptor.

Apesar de nossos resultados sugerirem o envolvimento desse polimorfismo na HAI-1, não houve associação de nenhum alelo com aumento de IgE. A ausência de fenômenos atópicos nos pacientes HAI-1 indica que os alelos presentes em nossa amostra formam genótipos diferentes, distintos dos encontrados na amostra coreana. Ainda nessa mesma região do cromossomo 5 estudamos o polimorfismo do *IL-5-746*, presente na região promotora do gene da IL-5, importante citocina na

diferenciação de linfócitos B e secreção de imunoglobulinas. Esse polimorfismo está relacionado com aumento de IgE nos indivíduos com genótipo CC e com diminuição da função pulmonar em crianças coreanas com asma (Hong et al., 2005). Não encontramos nenhuma associação entre esse polimorfismo e a HAI-1, nem com os níveis de IgE elevados presentes nesses pacientes.

Em resumo, a região 5q31 possui diversos genes que regulam direta ou indiretamente a produção de IgE e que também afetam a ativação e proliferação de elementos celulares envolvidos nas respostas inflamatória e humoral (Janeway et al., 2002). Dentre esses, os genes do grupo da IL-4 (IL-4, IL-5, IL-3 e GM-CSF) aparecem fortemente agrupados (Chandrasekharappa et al., 1990) e parecem ter efeitos sobrepostos sobre o crescimento e proliferação, principalmente de linfócitos B (Janeway et al., 2002). Este forte desequilíbrio de ligação favorece a formação de haplótipos que poderiam estar envolvidos em diversas doenças (Noguchi et al., 1997).

Assim, além das análises individuais, investigarmos se os polimorfismos presentes nessa região 5q, *IL-5-746*, *IL-13+110*, *IL-4-589* e *IL-4-33* analisados neste estudo configuram haplótipos de suscetibilidade à HAI.

Os resultados mostraram 3 haplótipos associados à HAI-1. O haplótipo CGCC (*IL-5-746*, *IL-13+110*, *IL-4-589* e *IL-4-33*, respectivamente), mostrou fraca associação negativa com a HAI-1. Outros dois haplótipos associados, TGCC e CACC, apresentaram associação positiva com a doença. Porém, o haplótipo CACC apresentou um intervalo de confiança

muito grande, provavelmente devido a baixa frequência no grupo-controle (Tabela 26)

Analizamos também os haplótipos formados pelos SNPs acima citados comparando-os conforme os níveis de IgE nos pacientes com HAI-1. Observamos um haplótipo, TACC, com fraca associação com os níveis de IgE elevados presente nos pacientes com HAI-1. Porém, esses haplótipos deverão ser investigados em maior número de amostras, uma vez existem alguns pontos conflitantes: na análise individual, o polimorfismo *IL-5-746* mostrou ausência de associação com a doença. No entanto, quando incluído nos haplótipos, o alelo *IL-5-746T* parece ter alguma importância, pois é observado tanto no haplótipo associado à HAI-1, como no haplótipo associado com IgE aumentada. Já, o polimorfismo *IL-13110A*, que mostrou, na análise individual, associação com doença sem associação com os níveis elevados de IgE, na análise haplotípica aparentemente estava associado com o nível aumentado de IgE dos pacientes com HAI-1. Apenas um aumento significativo do tamanho amostral, aliado a testes estatísticos que permitam correção para múltiplas análises permitirão a validação destes resultados. Uma outra abordagem seria a de analisar pacientes de outros centros e até em pacientes de diferentes etnias, para buscar a corroboração destas análises.

Os polimorfismos, *IL-10-3575*, *IL-10-2949*, *IL-10-2763*, *IL-10-1082* e *IL-10-592* no gene que codifica a IL-10, citocina anti-inflamatória capaz de modular a produção de IgE, também foram incluídos neste estudo.

Nenhum desses polimorfismos apresentou associação com HAI-1, exceto o polimorfismo *IL-10-2763*, que mostrou inicialmente uma fraca associação com a doença, mas que perdeu sua significância após a correção de Bonferroni. A presença do alelo G na posição-1082 está associada a maior expressão de IL-10 (Giordani et al 2003) e com menor risco (Langsenlehner et al 2005) no câncer de mama. Por outro lado, estudos de Cookson et al. (1999) confirmam nossos dados, uma vez que não observaram associação entre a HAI e os polimorfismos *IL-10-1082*, *IL-10-892* e *IL-10-592*, em pacientes ingleses e norte-americanos. Resultados concordantes ao nosso também foram encontrados por Fan et al (2005) tanto na hepatite auto-imune e como na cirrose biliar primária, em pacientes chineses. Ainda, Persico et al (2006) verificaram associação do genótipo GG do polimorfismo *IL-10-1082* com a gravidade da hepatite C.

Como esses polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 estão em forte desequilíbrio de ligação, diversos estudos têm avaliado o papel dos haplótipos que contêm esses polimorfismos, em diferentes doenças (Knapp et al., 2003; Zhang et al., 2007; Takakura et al., 2007)

Analisamos os haplótipos constituídos dos 5 polimorfismos presentes na região promotora do gene IL-10, *IL-10-3575*, *IL-10-2949*, *IL-10-2763*, *IL-10-1082* e *IL-10-592*. Observamos dois haplótipos com diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com HAI-1 e o grupo-controle. O primeiro haplótipo, *IL-10-3575T*, *IL-10-2849G*, *IL-10-2763C*, *IL-10-1082A*, *IL-10-592C* (TGCAC), mostrou inicialmente uma fraca associação com a HAI-1, que perdeu sua significância após a correção de

Bonferroni. O segundo haplótipo, *IL-10-3575T*, *IL-10-2849G*, *IL-10-2763C*, *IL-10-1082G*, *IL-10-592C* (TGCGC), mostrou associação negativa com a doença. Quando comparamos os haplótipos obtidos nos pacientes com HAI-1 relacionados aos níveis de IgE, observamos três haplótipos associados. O haplótipo TGCAC apresentou uma fraca associação positiva, com aumento de IgE, que perdeu a significância após a correção de Bonferroni. Outros dois haplótipos apresentaram associação negativa com aumento de IgE, TGCAA, e AAAGC.

O haplótipo TCATA tem sido associado ao aumento de expressão de IL-10 a doença do enxerto vs hospedeiro, no transplante de medula óssea (Lin et al., 2003). Devido ao desequilíbrio de ligação entre esses polimorfismos, esse haplótipo poderia ser totalmente determinado apenas pela posição *IL-10-592*, onde o alelo A indica a presença do haplótipo. O aumento dos níveis de expressão de IL-10 implica em maior controle de processos inflamatórios e auto-imunes por um lado, mas pode também levar a quadros infecciosos mais graves, nas quais a resposta efetora rica em IFN γ e TNF α é importante. Em concordância com esta observação, a homozigose para esse haplótipo foi recentemente associada à diminuição do risco da doença do enxerto vs hospedeiro, no transplante de medula óssea. (Lin et al., 2003). Ainda, haplótipos dos polimorfismos na região promotora de *IL-10* foram associados aos níveis aumentados de IgE em pacientes com dermatite atópica (Shin et al., 2005) e à doença celíaca (Núñez et al., 2006). A interpretação da análise haplotípica dos polimorfismos no gene IL-10 é difícil, já que individualmente não

observamos nenhuma associação com a doença. Por um lado, é necessário o maior conhecimento da produção de IL-10 vinculada aos diferentes haplótipos, e provavelmente em diferentes situações, já que as alterações em região promotora, biologicamente relevantes, costumam alterar o ancoramento dos diferentes fatores de transcrição, levando a diferença na transcrição gênica. Por outro lado, nossos resultados precisariam ser confirmados, com um aumento no número de amostras e até validação numa segunda amostra independente.

Salientamos ainda que o efeito biológico da IL-10 é mediado pelas duas sub-unidades de seu receptor, IL-10R1 e IL-10R2. Portanto, polimorfismos nos genes de seus receptores também são candidatos à suscetibilidade à HAI-1. Avaliamos 2 polimorfismos codificadores, *IL-10R1S138G* e *IL-10R1G330R*, presentes no receptor *IL-10R1*.

Polimorfismos no receptor 1 de IL-10 são comuns em indivíduos caucasóides e estão em forte desequilíbrio de ligação (Gasche et al., 2003). O polimorfismo *IL-10R1S138G* leva à substituição do aminoácido serina por glicina na molécula e essa substituição pode interferir na ligação da IL-10 com IL-10R1. Estudos *in vitro*, pelos mesmos autores, mostram também que monócitos tanto de indivíduos saudáveis quanto de portadores de doença de Crohn, que carregam a forma variante do *IL-10R330*, onde há substituição de glicina por arginina, são menos sensíveis à inibição da produção de TNFa mediada por IL-10.

O polimorfismo *IL-10R1S+138* mostrou associação com HAI-1 sendo que o alelo que codifica o aminoácido glicina apareceu aumentado nesses

pacientes. Entretanto, não observamos associação com os níveis de IgE aumentados desses pacientes. Já o polimorfismo *IL-10R1330* não mostrou associação com nem com a HAI-1 e nem com os níveis de IgE desses pacientes.

A associação do polimorfismo *IL-10R138* com a HAI-1 sugere haver o envolvimento do receptor na suscetibilidade à doença. Um receptor menos eficiente (glicina na posição 138) implicaria no “desbalanço” da resposta imune com predomínio de resposta inflamatória, maior suscetibilidade ao aparecimento de auto-imunidade e maior dano ao tecido hepático.

Finalmente, cabe aqui ressaltar ainda que, além do aumento do número de pacientes e/ou validação dos dados numa segunda amostra evidenciou-se a necessidade de conduzir estudos de ancestralidade nos pacientes aqui estudados. A distribuição distinta dos haplótipos estendidos que carregam DRB1*03 e DRB1*13, encontrados nos pacientes, quando comparados aos controles sadios, pode ser atribuída à suscetibilidade propriamente dita ou a uma estratificação do grupo não detectada previamente. Assim, apesar de termos tomado o cuidado de escolher amostras controle provenientes do mesmo "universo", ou seja, da população que utiliza os serviços do complexo hospitalar HCFMUSP, é possível que estejamos diante de um grupo de pacientes que carrega, além dos genes de suscetibilidade do CPH e das citocinas IL -4 e IL-13, todo um perfil genético diferente que os torna particularmente sujeitos ao desenvolvimento da hepatite auto-imune.

6. CONCLUSÕES

Os genes presentes na região do CPH (*HLA-DRB1-BAT1*, *NFKBIL1*, *LTA*, *MICA*, *HLA-B*) formam haplótipos estendidos muito variados. Destes genes, apenas os mais próximos ao “locus” *HLA-DRB1*, fortemente associado à doença, a saber *TNFA* e *LTA*, mostraram associação individual com HAI-1. Evidenciou-se a presença aumentada do haplótipo ancestral 8.1 nos pacientes HAI-1, revelando uma distribuição de haplótipos ligados a HLA-DR17 diferente em pacientes e controles.

O polimorfismo nas interleucinas implicadas na regulação dos níveis plasmáticos de IgE, a IL-4 e a IL-13, e nos receptores de IL-4, IL-13 e IL-10, mostraram associação com a suscetibilidade à HAI-1 evidenciando genes adicionais na suscetibilidade global à doença.

7.ANEXOS

ANEXO A– Frequência dos alelos do gene HLA-DRB em pacientes com HAI-1 e HAI-2 e em indivíduos saudáveis.

HLA- DRB1	HAI-1 N=105 (%)	HAI-2 N=25 (%)	Ctl N=145 (%)
*01	11 (0,10)	0 (0,00)	22 (0,15)
*02	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (0,02)
*04	18 (0,17)	2 (0,08)	33 (0,23)
*07	24 (0,23)	15 (0,60)	14 (0,10)
*08	5 (0,05)	4 (0,16)	18 (0,12)
*09	3 (0,03)	2 (0,08)	8 (0,06)
*10	5 (0,05)	2 (0,08)	5 (0,03)
*11	7 (0,07)	3 (0,12)	34 (0,23)
*12	1 (0,01)	1 (0,04)	6 (0,04)
*13	87 (0,83)	8 (0,32)	29 (0,20)
*14	5 (0,05)	2 (0,08)	12 (0,08)
*15	10 (0,10)	4 (0,16)	31 (0,21)
*16	6 (0,06)	0 (0,00)	7 (0,05)
17	28 (0,27)	7 (0,28)	30 (0,21)
18	1 (0,01)	0 (0,00)	5 (0,03)

ANEXO B - Análise do desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs entre DR*03(17) and DR13 e os alelos de genes de CPH de classe presentes no cromossomo 6

Gene/alelo	HAI-1			CtI		
	D'	X ²	p	D'	X ²	p
DRB1 17 vs TNFA -238G/A	0,1293	0,8656	0,3522	0.2405	3.8677	0.0492
DRB1 17 vs TNFA -308G/A	0,3827	18,6612	<0,0001	0.1548	6.0237	0.0141
DRB1 17 vs LTA 252	0,7093	25,8865	<0,0001	0.2456	4.8861	0.0271
DRB1 17 vs LTA 80	0,8864	11,6335	0,0006	0.3486	2.7146	0.0994
DRB1 17 vs NFKBIL -63	0,4847	12,5879	0,0004	0.1364	1.2009	0.0731
DRB1 17 vs BAT1 -348	0,2080	0,2211	0,6382	0.0552	0.0221	0.8819
DRB1 17 vs BAT1 -22	0,5126	13,4673	0,0002	0.0767	0.4498	0.5024
DRB1 17 vs MICA *09	-0,3478	0,4908	0,4836	1.0000	6.3012	0.0121
*08	0,3750	5,8413	0,0157			
*04	0,6591	1,6750	0,1956			
DRB1 17 vs HLA-B*08	0,4246	35,5614	<0,0001	-	-	-
DRB1*13 vs TNFA -238G/A	-0,3916	0,8908	0,3453	0.0083	0.0055	0.9409
DRB1*13 vs TNFA -308G/A	0,3502	3,9168	0,0478	0.1124	3.0414	0.0812
DRB1*13 vs LTA 252	0,1155	1,1955	0,2742	0.2678	4.8262	0.0280
DRB1*13 vs LTA 80	0,1091	1,6845	0,1943	0.5202	5.0203	0.0251
DRB1*13 vs NFKBIL -63	0,0305	0,0803	0,7769	0.3214	5.5426	0.0186
DRB1*13 vs BAT1 -348	0,1750	0,7341	0,3916	0.3282	0.6429	0.4226
DRB1*13 vs BAT1 -22	0,2880	0,5870	0,0108	0.3981	10.007	0.0016
DRB1*13 vs MICA *09	-0,2790	0,3645	0,5460	-	-	
*08	0,2790	0,1383	0,7100			
*04	0,3883	5,5383	0,0186			
DRB1*13 vs HLA-B *08	0,6367	8,6725	0,0032	0.3257	4.3661	0.0367

ANEXO C – Análise do desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs *IL-5 -746T/C*, *IL-13 110 Arg/Gln*, *IL-4 - 589C/T*, *IL-4 +33 C/T* presentes no cromossomo 5

Gene/alelo	AIH-1			Ctl		
	D'	c ²	p value	D'	c ²	p value
<i>IL-5 -746C/T vs IL-13 110Arg/Gln</i>						
<i>IL-5 -746C vs IL-13 110Arg</i>	0.5060	29.1669	<0.0001	0.6213	17.1588	<0.0001
<i>IL-5 -746T vs IL-13 110 Gln</i>						
<i>IL-13 110Arg/Gln vs IL-4 -589C/T</i>						
<i>IL-13 110Arg vs IL-4 -589C</i>	0.2916	11.6572	0.0006	0.2741	5.8804	0.0153
<i>IL-13 110 Gln vs IL-4 -589T</i>						
<i>IL-13 110Arg vs IL-4 -33 C</i>	0.4502	28.5145	<0.0001	0.1993	2.8206	ns
<i>IL-13 110 Gln vs IL-4 -33 T</i>						
<i>IL-4 -589C/T vs IL-4 -33 C/T</i>						
<i>IL-4 -589C vs IL-4 -33 C</i>	0.7112	105.4627	<0.0001	0.7169	91.3346	<0.0001
<i>IL-4 -589T vs IL-4 -33 T</i>						

HAI-1: hepatite auto-imune tipo 1; Ctl: Controle; ns: não significante

ANEXO D – Análise do desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs *IL-10-3573*, *IL-10-2849*, *IL-10-2763*, *IL-10 -1082* e *IL-10-592*, presentes na região promotora do IL-10, entre pacientes com HAI-1 e controles

Gene/alelo	AIH-1			Ctl		
	D'	c ²	p value	D'	c ²	p value
<i>IL-10 -3575A/T vs -2849A/G</i>						
<i>-3575A vs -2849A</i>	0,6957	57,24	<0,0001	0.6152	100,04	<0.0001
<i>-3575T vs -2849G</i>						
<i>IL-10 -3575A/T vs -2763A/C</i>						
<i>-3575A vs -2763A</i>	0,6897	85,56	<0,0001	0,6902	178,51	<0,0001
<i>-3575T vs -2763G</i>						
<i>IL-10 -3575A/T vs -1082G/A</i>						
<i>-3575A vs -1082G</i>	0,5295	85,12	<0,0001	0,8584	235,43	<0,0001
<i>-3575T vs -1082A</i>						
<i>IL-10 -3575A/T vs -592C/A</i>						
<i>-3575T vs -592A</i>	0,8681	23,34	<0,0001	0,8299	64,00	<0,0001
<i>-3575A vs -592C</i>						
<i>IL-10 -2849A/G vs -2763A/C</i>						
<i>-2849G vs -2763C</i>	0,8261	80,72	<0,0001	0,7018	121,98	<0,0001
<i>-2849A vs -2763A</i>						
<i>IL-10 -2849A/G vs -1082G/A</i>						
<i>-2849G vs -1082A</i>	0,8033	48,86	<0,0001	0,5999	119,09	<0,0001
<i>-2849A vs -1082G</i>						
<i>IL-10 -2849A/G vs -592C/A</i>						
<i>-2849G vs -592A</i>	0,9077	16,74	<0,0001	0,9328	53,44	<0,0001
<i>-2849A vs -592C</i>						
<i>IL-10 -2763A/C vs -1082G/A</i>						
<i>-2763C vs 1082A</i>	0,7541	65,53	<0,0001	0,7439	165,67	<0,0001
<i>-2763A vs 1082G</i>						
<i>IL-10 -2763A/C vs -592C/A</i>						
<i>-2763C vs -592A</i>	0,8022	19,93	<0,0001	0,9074	81,67	<0,0001
<i>-2763A vs -592C</i>						
<i>IL-10 -1082G/A vs -592C/A</i>						
<i>-1082A vs 592A</i>	0,4748	10,91	0,0010	1,000	74,24	<0,0001
<i>-1082G vs 592C</i>						

HAI-1: hepatite auto-imune tipo 1; Ctl: Controle

ANEXO E - Resumo dos SNPs estudados

gene	SNP	localização	Troca	Associação *
TNFA	-308	promotor	G por A	alelo A= aumento produção TNF; suscetibilidade a HAI, AR
	-238	promotor	G por A	alelo A= aumento transcrição; suscetibilidade a AR, FR, esclerose múltipla
LTA	+80	Íntron 1	A por C	alelo A= aumento da produção: associado a cardiomiopatia chágasica
	+252	Íntron 1	A por G	alelo G = aumento produção
TNFR1	+36	Éxon 1	A por G	alelo G=aumento da apoptose; associação negativa c/ AR
	-609	Promotor	G por T	alelo T= associação negativa c/ forma esporádica AR
TNFR2	+196	Éxon 6	T por G T=Metionina G=Arginina	alelo G= suscetibilidade a AR, LES
	+1466	Éxon 10	G por A	alelo G= associado à Doença de Chron
NFKBIL1	-63	promotor	T por A	T= susceptibilidade AR
BAT1	-348	promotor	C por T	alelo C= diminuição produção; suscetibilidade diabetes tipo 1
	-22	promotor	C por G	C= diminuição expressão
IL-4	-589	promotor	C por T	alelo T= aumento IgE (japoneses e americanos); suscetibilidade a AR
	+33	Íntron 1	C por T	alelo T =aumento IgE (japoneses); aumento transcrição IL-4
	+3017	Íntron 2	G por T	alelo T = aumento IgE; aumento transcrição
IL-13	110	Éxon 4	G por A A=glutamina G=arginina	alelo G = aumento IgE; suscetibilidade a artrite idiopática infantil
IL-4R1	50	Éxon 1	A por G A=Valina G= isoleucina	alelo G= aumento atopia, au/o IgE? alelo A = erosão AR
IL-13RA1	+1398	Íntron	A por G	G= aumento atopia, au/o IgE? A= associado à asma
IL-5	-746	promotor	C por T	alelo C = aumento IgE; genótipo CC diminuição da função pulmonar
IL-10	-3575	promotor	A por T	não determinado isolado
	-2849	promotor	A por G	não determinado isolado
	-2763	promotor	A por C	alelo A= diminui produção
	-1082	promotor	G por A	alelo G= aumento produção, GG apareci/o linfoma em HCV
	-592	promotor	C por A	Alelo A= aumento expressão; protetor
IL-10R1	138	Éxon	S por G S= serina G=Glicina	aa G = diminui afinidade do receptor
	330	Éxon	G por R G=Glicina R=Arginina	aa R= menos sensível inibição produção de TNF mediada por IL-10

* a associação pode ser diferente de acordo com a população estudada

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nature Rev Immunol.* 1996;35:94-100.

Allcock RJ, Williams JH, Price P. The central MHC gene, BAT-1, may encode a protein that down-regulates cytokines production. *Genes Cells.* 2001;6:497-4.

Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WGE, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston ALWF, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RNM, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Mieli-Vergani G, Nakanuma Y, Nishioka M, Penner E, Porta G, Portmann BC, Reed WD, Rodes J, Schalm SW, Scheuer PJ, Schrumpf E, Seki T, Toda G, Tsuji T, Tygstrup N, Vergani D, Zeniya M. International autoimmune hepatitis group. Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1999;31:929-38.

Arnold B, Alferink J, Limmer A, Tafuri A, Hämmerling GJ. Reversal of peripheral T-cell tolerance: implications for autoimmunity. In: Svejgaard A, Buus S, Fugger, L. (Ed). HLA and diseases – the molecular basis. Copenhagen: Munksgaard, 1997; 3815 -22.

Bakker PIW, McVean G, Sabeti PC, Miretti MM, Green T, Marchini J, Ke X, Monsuur AJ, Whittaker P, Delgado M, Morrison J, Richardson A, Walsh EC, Gao X, Galver L, Hart J, Hafler DA, Pericak-Vance M, Todd JA, Daly MJ, Trowsdale J, Wijmenga C, Vyse TJ, Beck S, Murray SS, Carrington M, Gregory S, Deloukas P, Rioux JD. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet.* 2006;38:1166-72.

Barton A, John S, Ollier WE. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor type II, but not tumor necrosis factor type I, in Caucasians. *Arthritis Rheum.* 2001;44:61-5.

Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, Harkins MS, Meyers DA, Bleecker ER. A comprehensive evaluation of *IL-4*

variants in ethnically diverse populations: Association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:80-7.

Bayley JP, de Rooij H, van den Else PJ, Huizinga TW, Verweij CL. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF- α promoter. *Cytokine.* 2001;14:316-323.

Beghé B, Barton S, Rorke S, Peng Q, Sayers I, Gaunt T, Ketihis TP, Clough JB, Holgate ST, Holloway JW. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor α chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:1111-7.

Benoist C, Mathis D. Autoimmunity: the pathogen connection. *Nature.* 1998;394:227-8.

Bignon JD, Viña MF. 12th IHWG HLA Class II Reference Protocol. In: Technical Handbook of 12th International Histocompatibility Workshop, ed. Fauchet and Charron, HLA et Médecine, Paris, 1995.

Bittencourt PL, Palacios SA, Cançado EL, Porta G, Drigo S, Carrilho FJ, Laudanna AA, Kalil J. Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor α polymorphisms at position -308. *J Hepatol.* 2001; 35: 24-28.

Bittencourt PL, Goldberg AC, Cançado ELR, Porta G, Carrilho FJ, Farias AQ, Palacios SA, Laudanna AA, Kalil J. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *A J Gastroenterol.* 1999; 94: 1906-13.

Bittencourt, PL, Palacios, S.A., Cançado, E.L.R., Porta, G., Carrilho, F.J., Laudanna, A.A., Kalil, J., Goldberg, A.C. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphism do not confer susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2 in Brazil. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:1616-20.

Bodmer W. HLA polymorphism: origin and maintenance. In: Terasaki PI, Gjertson DW (ed). HLA 1997. Los Angeles: ECLA Tissue Typing Laboratory; 1-6, 1997.

Boodhoo A, Agnes M, Wong L, Williamson D, Voon D, Lee S, Allcock RJN,

Price P. A promoter polymorphism in the central MHC gene, IKBL, influences the binding of transcription factors USF1 and E47 on disease-associated haplotypes. *Gene Expression*. 2004;12:1-11.

Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*. 2003;33 (suppl):S228-37.

Bouqbis L, Akhayat O, Garchon HJ, Calafell F, Izaabel H. TNFA-TNFB haplotypes modify susceptibility to type I diabetes mellitus independently of HLA class II in a Moroccan population. *Tissue Antigens*. 2003;61:72-9.

Breen EC. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol Ther*. 2002 Sep;95:295-304.

Buer J, Lanque A, Franke A, Garcia C, Von Bochmer H, Sarukhan A. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized *in vivo*. *J Exp Med*. 1998;187:177-83.

Bugawan TL, Mirel DB, Valdes AM, Panelo A, Pozzilli P, Erlich HA. Association and interaction of IL-4R, IL-4, and IL-13 loci with type 1 diabetes among Filipinos. *Am J Hum Gen*. 2003; 72:1505-14.

Carlsen H, Alexander G, Austenaa LMI, Ebihara K, Blomhoff R. Molecular imaging of transcription factor NF- κ B, a primary regulator of stress response. *Mutat Res*. 2004;551:199-211.

Cartegni L, Chew S, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Rev Genet*. 2002;3:285-98.

Celedon JC, Soto-Quiros ME, Palmer LJ, Senter J, Mosley J, Silverman EK, Weiss ST. Lack of association between a polymorphism in the interleukin-13 gene and total serum immunoglobulin E level among nuclear families in Costa Rica. *Clinical and Experimental Allergy*. 2002;30:387-90.

Chandrasekharappa SC, Rebelsky MS, Firak RA, Le Beau MM, Westbrook CA. A long-range restriction map of the interleukin-4 and interleukin-5 linkage group on chromosome 5. *Genomic*. 1990;6:94-99.

Cheong KY, Allcock RJ, Eerligh P, Witts CS, Christiansen FT, McCann V, Price P. Localization of central MHC genes influencing type I diabetes. *Hum Immunol*. 2001; 62: 1363-70.

Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Bernal W, Czaja AJ, Donaldson PT. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 1999;30:851-6.

Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, et al. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1999;117:645-52.

Czaja AJ, Doherty DG, Donaldson PT. Genetic bases of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci*. 2002; 47(10):2139-50.

Czaja AJ. Understanding the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:1224-31.

Dausset J. Isoleucoanticorps. *Acta Haematol*. 1958; 20:156-9.

Dimasi N, Moretta L, Biassoni R. Structure of the Ly49 family of natural killer (NK) cell receptors and their interaction with MHC class I molecules. *Immunol Res*. 2004;30(1):95-104.

Ding Y, Xia B, Lu M, Zhang Y, Li J, Ye M, Luo H, Yu J, Zhang X, Tan J. MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:193-8.

Djilali-Saiah I, Renous R, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. Linkage disequilibrium between HLA class II regions and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *J Hepatol*. 2004;40: 904-9.

Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Mady C, Faé KC, Buck P, Kalil J, Goldberg AC. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas's cardiomyopathy patients. *Microbes Infect*. 2006;8:598-603.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* (in press). Disponível em <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/> Acesso em 17 ago. 2005.

Fabris M, Di PE, D'Elia A, Damante G, Sinigaglia L, Ferracioli G. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29:29-33.

Fan LY, Tu XQ, Pfeiffer T, Feltens R, Stoecker W, Zhong RQ. Genetic association of cytokines polymorphisms with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis in the chinese. *World J Gastroenterol*. 2005;11(18): 2768-72.

Field M. Tumor necrosis factor polymorphisms in rheumatic diseases. *Q J Med*. 2001; 94: 237-46.

Flinbloom DS, Winestock KD. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of TYK2 and Jak 1 and the differential assembly of STAT1a and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol*. 1995;155:1079-

Gasche C, Grundtner P, Zwirn P, Reinisch W, Shaw SH, Zdanov A, Sarma U, Willms LM, Foxwell BM, Ganl A. Novel variants of the IL-10 receptor 1 affect inhibition of monocyte TGF-alpha production. *J Immunol*. 2003;170:5578-82.

Giordani L, Bruzzi P, Lasalandra C, Quaranta M, Schittulli F, Della Ragione F, Iolascon A. Association of breast cancer and polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha genes. *Clin Chem*. 2003; 49:1664-7.

Goldberg AC, Bittencourt PL, Mougi B, Cançado LR, Porta G, Carrilho F, Kalil J. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: identifying the major susceptibility locus. *Hum Immunol*. 2001;62:165-9.

Goldberg AC, Bittencourt PL, Oliveira LC, Ramasawmy R, Marin MLC, Palacios SA, Kalil J, Porta G. Autoimmune hepatitis in Brazil: an overview. *Scand J Immunol*. 2007; 266:208-16.

Granja CB, Salazar M Yunis EJ. Population genetic and human leukocyte

antigen polymorphism. In: Tilney NL, Strom TB, Paul LC, editors. *Transplantation Biology: cellular and molecular aspects*. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia; 1996:311-25.

Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritzsche C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E, Martinez FD. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:506-13.

Groh V, Rhinehart R, Secristi H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *PNAS*. 1999; 96:6879-84.

Grubic Z, Zunec R, Peros-Golubicic T, Tekavec-Trkanjec J, Martinez N, Alilovic M, Smojver-Jezek S, Kerhin-Brkljacic. HLA class I and class II frequencies in patients with sarcoidosis from Croatia: role of HLA-B8, -DRB1*0301, and DQB1*0201 haplotype in clinical variations of the disease *Tissue Antigens*. 2007;70:301-6.

Grunig G, de Vries JE, Malefyt RW. Interleukin-13. In: Thomson, AW, Lotze MT. *The cytokine handbook*. 4^a ed. Local Editora;2003.

Guo S, Thompson E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. Local Editora;1992;.48:.361-72.

Heinzmann A, Jerkic SP, Ganter K, Kurs T, Blattmann S, Schuchmann L, Gerhold K, Berner R, Deichmann K. Association study of the IL-13 variant Arg110Gln in atopic diseases and juvenile idiopathic arthritis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:735-9.

Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kremer R T, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto RR, Arima K, Arinobu Y, Yu B, Kruse S, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Shimasu S, Sasaki S, Adra CN, Kitaishi M, Inoue H, Yamauchi K, Tomichi N, Kurimoto F, Hamasaki N, Hopkin JM, Izuhara K, Shirakawa T, Deichmann KA. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Gen..*

2000;9:549-59.

Hijazi Z, Haider MZ. Interleukin-4 gene promoter polymorphism [C590T] and asthma in Kwaiti Arabs. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;122:190-4.

Hiromatsu Y, Fukutani T, Ichimura M, Mukai T, Kaku H, Nakayama H, Miyake I, Shoji S, Koda Y, Bednarczuk T. Interleukin-13 Gene Polymorphisms Confer the Susceptibility of Japanese Populations to Graves' Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:296-301.

Höfer T, Nathansen H, Löhning M, Radbruch A, Heinrich R. GATA-3 transcriptional imprinting in Th2 lymphocytes: a mathematical model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:9364-8.

Hoffjan S, Ostrovnaja I, Nicolae D, Newman DL, Nicolae R, Gangnon R, Steiner L, Walker K, Reynolds R, Greene D, Mirel D, Gern JE, Lemanske RF, Ober C. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:511-8.

Hohler T, Kruger A, Schneider PM, Shopj RE, Knop J, Rittner C, Meyer zum Buschenfelde KH, Marker-Hermann E, A. TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol*. 1997;109:562-5.

Holmes CL, Russel JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest*. 2003 Sep;124:1103-15.

Hong SJ, Lee SY, Kim HB, Kim JH, Kim BS, Choi SO, Lee SG, Shin ES, Hong TJ. IL-5 and thromboxane A2 receptor gene polymorphisms are associated with decreased pulmonary function in Korean children with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:758-63.

Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Brudford EA, Khodyar K, Lush MJ, Povey S, Talbot CC, Wright MW, Main HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. MHC gene extended map. *Nat Rev Genet*. 2004;5(12):889-99.

Huizinga TWJ, Westendorp RGJ, Bollen ELEM, Keijjers V, Brinkmann BMN,

Langermans JAM, Bredveld FC, Verveij CL. van de Gaer L, Dams L, Crusius JBA, Garcia-Gonzales A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS. TNF- α promoter polymorphism, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol.* 1997; 72:149-53.

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols. Academic Press, 1990.

Inquérito Nacional sobre Hepatite Auto-imune (HAI) - Sociedade Brasileira de Hepatologia (1997-1999). Disponível em: <http://www.sbhepatologia.org.br/nacional/inquer.htm>.

Jacob CO, Aiso S, Michie SA, McDevitt HO, Acha-Orbea H. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF- α and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(3):968-72.

Janeway Jr CA, Travers P, Walport M. Shlomchik; trad Bonorino C et al. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença* 5ªed. Artmed, Porto Alegre;189-375; 2002.

Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D. A complete screening of the IL-4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Immunol.*2003;112:893-8.

Kalil J, Goldberg AC, Rizzo LV. Genômica e imunologia. In MirL. (org). *Genômica*. São Paulo: Atheneu, 2004:411-29.

Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, Maerker-Hermann E, Hoehler T. Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol.* 2000;114:1180-3.

Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *Adv Immunol.* 2001; 344; 655-64.

Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science.*2003;300:1527-8.

Kim HB, Lee YC, Lee SY, Jung J, Jin HS, Kim JH, Kim BS, Kang MJ, Jang SO, Kim J, Kimm K, Shin ES, Lee SG, Hong SJ. Gene-gene interaction between IL-13 and L-13Ra1 is associated with total IgE in Korean children with atopic asthma. *J Hum Genet.* 2006;51:1055-62.

Knapp S, Hennig BJW, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, Goldin R, Hill AVS, Thomas HC, Thursz MR. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics.* 2003; 55:362-9.

Knight JC, Keting BJ, Kwiatkowski DP, Allele-specific repression of lymphotoxin-alpha by activated B cell factor-1. *Nat Genet.* 2004;36:394-9.

Knolle PA, Limmer A. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol.* 2001;22:432-7.

Komata T, Tsuchiya N, Matsushita M, Hagiwara K, Takinaga K. Association of tumor necrosis factor receptor II (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigen.* 1999; 53:527-33.

Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T. MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics.* 1999;49:620-8.

Kozaiwa K, Sugawara K, Smith MF Jr, Carl V, Yamschikov V, Belyea B, McEwen SB, Moskaluk CA, Pizarro TT, Cominelli F, McDuffie M. Identification of a quantitative trait locus for uveitis in a spontaneous mouse model of Crohn's disease: SAMP1/YitFc. *Gastroenterology.* 2003;125:471-90.

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol. Immunol.* 1997;34:391-99.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;860-921.

Langsenlehner U, Krippel P, Renner W, Yazdani-Biuki B, Eder T, Köppel H, Wascher TC, Paulweber B, Samonigg H. Interleukin-10 promoter

polymorphism is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treatment*. 2005;90:113-5.

Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*.1964;49:.49-67.

Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med*.2000; 38:403-12.

Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2003;349:2201-10.

Liu ZX, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. Fas-mediated apoptosis causes elimination of virus-specific cytotoxic T cells in the virus-infected liver. *J Immunol*. 2001;166:3035-41.

Luomala M, Lehtimäki T, Huhtala H, Ukkonen M, Koivula T, Hurme M, Elovaara I. Promoter polymorphism of IL -10 and severity of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2003;108:396-400.

Mackay IR, Rowley MJ. Autoimmune epitopes: autoepitopes. *Autoimmun Rev*.2004; 3:487-92.

Mackay IR. Hepatoimmunology: a perspective. *Immunol Cell Biol*.2002; 80:36-44.

Mackay IR. Taft LI, Cowling DC. Lupoid hepatitis. *Lancet*.1956;1323-6.

Mackay IR. The hepatitis-lupus connection. *Semin Liver Dis*. 1991;11:234-40.

Mangia A, Santoro R, Piatelli M, Pazienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A. A IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCR infection. *Cytokine*. 2004;25:103-9.

Manns MP. Autoimmune hepatitis. In Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. Shiffi's Diseases of the liver. 8^{ed}. Lippincott-Raven Publishers,

Filadelfia;1999 :919-95.

Marin MLC, Savioli CR, Yamamoto JH, Kalil J, Goldberg AC. MICA polymorphism in a sample of the São Paulo population, Brazil. *Eur J Immunogenetics*. 2004; 31:63-71.

McFarlane IG. Definition and classification of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis*.2002;22:317-24.

Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Riethmuller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus an NCO I polymorphism in the first intron of the human TNFb gene correlates with a variant amino acid position 26 and a reduced level of TNF-beta product. *J Exp Med*.1991; 173:209-19.

Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CIM, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC, Bleeckers ER. Evidence for a locus regulation total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics*. 1994;23:464-70.

Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Lepiattois P, Liazun P, Miloux B, Minty C, Casella P, Loison G, Lupker J, Shire D, Ferrara P, Caput D. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*.1993;362:248-50.

Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, Kawai M, Sasaki S, Dake Y, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM. Ile50Val variant of IL-4Ra upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma [correspondence]. *Nat Genet*1998;19:119-20.

Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM, Izuhara K. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor α -chain in IgE synthesis. *J Immunol*. 1999;162:1227-31.

Mocellin S, Marincola R, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptative immunity; putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:61-76.

Moreno M, Silva EL, Ramirez LE, Palacio LG, Rivera D, Arcos-Burger. Chagas' disease susceptibility/resistance: linkage disequilibrium analysis suggests epistasis between major histocompatibility complex and interleukin-10. *Tissue Antigens*. 2004;64:18-24.

Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H. Association of tumor necrosis receptor type II polymorphism 196R with systemic lupus erythematosus in the Japanese: Molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum*. 2001;44:2819-27.

Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe AC, Szymanza B, Tronczynska E, Plucienniczak A, Selmaj K. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J Neuroimmunol*. 1998;84:198-206.

Nanba T, Watanabe M, Akamizu T, Iwatani. The -590CC genotype in the IL-4 gene as a strong predictive factor for development of hypothyroidism in Hashimoto. *Clin Chem*. 2008;54: 621-623.

Nishimura M, Obayashi H, Mizuta I, Hara H, Adachi T, Ohta M, Tegoshi H, Fukui M, Hasegawa G, Shigeta H, Kitagawa Y, Nakano K, Kaji R, Nakamura N. TNF, TNF receptor type 1, and allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in japanese patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol*. 2003;64:302-9.

Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K., Maki T, Miyamoto T, Kawashima T, Kobaiashi K, Hamaguichi. Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-33 in a Japanese population. *Am J Resp Crit Care Med*. 1997; 156: 1390-3.

Nuñez C, Alecsandru D, Varadé J, Polanco I, Maluenda C, Fernández-Arquero M, Concha EG, Urcelay E, Martinez A. Interleucin-10 haplotypes in celiac disease in Spanish population. *BMC Med Genet*. 2006;7:32-6.

Nuñez C, Santiago JL, Varadé J, de la Calle H, Figueredo MA, Fernandez-Gutierrez B, de la Concha EG, Urcelay E, Martinez A. IL-4 in the 5q31

context: association studies of type 1 diabetes and rheumatoid arthritis in the spanish population. *Immunogenetics*. 2008;60:19-23.

Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagarsuka, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H. Identification of I?BL as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility "locus" for rheumatoid arthritis. *Am J Hum Gen*. 2003; 72: 303-12.

Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Mizuki N, Otoh K, Sasazuki T, Inoko H. A second susceptibility gene developing rheumatoid arthritis in human MHC is localized within a 70kb interval telomeric of TNF genes in the HLA class III region. *Genomics* 2001;71:263-70.

Ovington KS, McKie K, Matthaei KI, Young IG, Behm CA. Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. *Immunology*. 1998; 95: 488-93.

Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. Functional SNPs en the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*. 2002;32(4):650-4.

Pardoll DM. Stress NK receptors, and immune surveillance. *Science*. 2001;294:534-6.

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

Persico M, Capasso M, Persico E, Masarone M, de Renzo A, Spano D, Bruno S, Iolascon A. Interleukin-10-1082 GG polymorphism influences the occurrence and the clinical characteristics of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2006;45:779-85.

Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics*. 1999;49:605-12.

Pociot F, D'Alfonse S, Compasso S, Scorza R, Richiard PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF-alpha gene promoter. *Scand J Immunol.*1995; 42:501-4.

Porta G, Schneidwind KDR, Ribeiro CMF. Autoimmune hepatitis type 1 in children is associated to high IgE levels (abstract). *J Pediatric Gastroenterol.* 2004;39(supl.):S185.

Porta, G. Hepatite auto-imune na infância. Análise clínico-laboratorial, histológica e evolutiva. São Paulo, 1993. 189p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Price P, Wong AML, Williamson D, Voon D, Baltic S, Allcock RJN, Boodhoo A, Christiansen FT. Polymorphisms at positions -22 and -348 in the promoter of the BAT1 gene affect transcription and the binding of nuclear factors *Hum Mol Gen.* 2004;13:967-74.

Pritchard MA, Baker E, Whitmore SA, Sutherland GR, Idzerda R L, Park LS, Cosman D, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Beckmann MP. The interleukin-4 receptor gene (IL-4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7. *Genomics.* 1991; 10:801-6.

Probst CM. Convert: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos, versão 1.1. Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, 1998.

Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yoné CL, Spriewald B, Burkhardt H, Rau R, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H. Association of the IL-4R single-nucleotide polymorphism 150V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:1491-500.

Punnonen J, Malefyt RW, Van Vlasselae P, Gauchat JF, Vries JE. IL-10 and and viral IL-10 prevent IL-4 induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol.* 1993; 151:1280-9.

Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Faé KC, Muller NG, Cavalcanti VL, Drigo SA, Ianni B, Mady C, Kalil K, Goldberg AC. HLA-B associated transcript 1, a

putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2006;193:1394-9.

Ramasawmy R, Faé KC, Spina G, Victora GD, Tanaka AC, Palacios SA, Hounie AG, Miguel EC, Oshiro SE, Goldberg AC, Kalil J, Guilherme L. Association of polymorphisms within the promoter region of the tumor necrosis factor- α with clinical outcomes of rheumatic fever. *Mol Immunol* . 2007; 44:1873-8.

Reus E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors – a twin study. *Genes Immun.* 2002;3:407-13.

Rocha N, Neefjes J. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO J.* 2008; 27:1-5.

Rosenwasser LJ, Flemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali J.J, Klennert M, Borish L. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy.* 1995;25:74-8.

Sacca R, Cuff CA, Lesslauer W, Ruddle NH. Differential activities of secreted lymphotoxin- α 3 and membrane lymphotoxin- α 1 β 2 in lymphotoxin-induced inflammation: critical role of TNF receptor 1 signaling. *J Immunol.* 1998;160:485-90.

Sashio H, Tamura K, Ito R. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Chron's disease, respectively. *Immunogenet.* 2002;53:1020-7.

Shen HH, Ochkur SI, McGarry MP, Crosby JR, Hines EM, Borches MT, Wang H, Biechelle, TL, O'Neill KR, Ansay TL, Colbert DC, Cormier SA, Justice JP, Lee NA, Lee JJ. A causative relationship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse. *J Immunol.* 2003;170:3296-3305.

Shen LX, Basilion JP, Stanton Jr VP. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *PNAS.* 1999;96:7871-6.

Shichi D, Kikkawa EF, Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Matsumori A, Kulski JK, Naruse TK, Inoko H. The haplotype block, NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1-MICB-MICA, within the class III – class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus-associated dilated cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 2005;66:200-8.

Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim JS, Kim JW. Interleukin-10 haplotype associated with total serum IgE in atopic dermatitis patients. *Allergy*. 2005; 60:1146-51.

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

Silva LC, Carrilho, FJ, Di Pietro A. Chronic hepatitis in São Paulo, Brazil. General data and clinical forms. *Gastrointest Hepatol* 1986; 9: 340-3.

Simmonds MJ, Heward JM, Howson JM, Foxall H, Nithiyananthan R, Franklyn JA, Gough SC. A systematic approach to the assessment of known TNF-alpha polymorphism in Graves's disease. *Genes Immun*. 2004;5:267-73

Singal DP, Li J, Zhu Y. Genetic basis for rheumatoid arthritis. *Arch Immunol. Ther Exp*. 1999;47:307-11.

Smirnov DV, Smirnova MG, Korobko VG, Frolova EI. Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13 resemblance in their organization. *Gene*, 1995;155:277-81.

Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, Geall MG, Gitnick GL, Elveback IR, Schoenfield LJ. Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology* 1972;63:820-833.

Stephens HAF, Vaughan RW, Collins R, Kondreatis E, Theron J, Paine A. Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphisms in exons 2,3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens*. 1999;53:167-74.

Stephens M, Scheet P. Accounting for Decay of Linkage Disequilibrium in

Haplotype Inference and Missing-Data Imputation. *Am J Hum Gen.* 2005; 76 :449-62.

Suzuki I, Hizawa N, Yamaguchi E, Hizawa N, Kawakami Y. Association between a C+33T polymorphism in the IL-4 promoter region and total serum IgE levels. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1746-9.

Takakura M, Tokushige K, Matsushita N, Hashimoto E, Shiratori K. Possible involvement of cytokine gene polymorphisms in fulminant hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:1271-7.

The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature.* 1999; 401:921-3.

Tian W, Boggs DA, Ding WZ, Chen DF, Fraser PA. MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 29 African-American families. *Immunogenetics.* 2001;53:724-8.

Todd JA. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *BioEssays.* 1999;21:164-74.

Tolusso B, Fabris M, Caporali R, Cuomo G, Isola M, Soldano F, Montecucco C, Valentini G, Ferraccioli G. -238 and +438 TNF- α along with TNF-RII gene polymorphisms associate with diffuse phenotype in patients with systemic sclerosis. *Immunol Lett.* 2005; 96:103-8.

Uglieri AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, Hartl D, Yunis EJ, Goldfeld AE. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor- α gene promotor. *Tissue Antigens.* 1998;52:359-67.

Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin 4 : Interleukin 4 suppress interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *PNAS.* 1992; 89;. 4076-80.

Vasquez-Garcia MN, Aláez C, Olivo A, Debaz OH, Perez-Luque E, Burguete A, Cano S, Rosa G, Bautista N, Hernández, Bandera J, Torres LF, Kershenovich D, Alvarez F, Gorodezky. MHC class II sequences of

susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1998;28: 985-90.

Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2008;14:3306-12.

Vergani D, Mieli-Vergani G. Mechanisms of autoimmune hepatitis. *Pediatr Transplant.* 2004; 8:589-93.

Verra F, Luoni G, Calissano, Troye-Blomberg M, Perlmann P, H Perlmann, Arca B, Sirima BS, Konaté A, Clouzzi M, Kwiatkowski D, Modiano D. IL-4 - 589C/T polymorphism and IgE levels in severe malaria. *Acta Trop.* 2004; 90:205-9.

Vilcek J. The cytokines: an overview. The Cytokine Handbook, 4. Ed., Angus W Thomson & Michael T. Avon: Lotze editors, 2003, 1396 p.

Vladich FD, Brazille SM, Stern D, Peck ML, Ghittoni R, Vercelli D. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest.* 2005;115:747-54.

Walley AJ, Cookson WO. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet.* 1996;33:689-92.

Wascke KA, Villani AC, Vermeire S, Dufresne L, Chen TC, Vitton A, Cohen A, Thomson ABR, Wild GE. Tumor necrosis factor receptor gene polymorphisms in Chron's Disease: association with clinical phenotypes. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100:1126-33.

Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A . Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet.* 1997;349:1912-3.

Wills-Karp M. The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits. *Respir Res.* 2000;1:19-23.

Woolf, B. On estimating the relation between blood group and disease. *Annals of Human Genetics*.1955; 19: 251-3.

Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, Kawakami Y. The gene polymorphism of tumor necrosis factor-b, but not that of tumor necrosis factor-alpha, is associated with the prognosis of sarcoidosis. *Chest*. 2001;119:753-61.

Yoshioka K, Yoshida T, Takakura Y, Umekawa T, Kogure A, Toda I, Yoshikawa T. Relationship between polymorphisms 804C/A and 252A/G of lymphotoxin- gene and -308G/A of tumor necrosis factor gene and diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*.2006;55:1406-10.

Zhang X, Hei P, Deng L, Lin J. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and their protein production in peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2007;13:135-40.

Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B, Stastny P. Typing for all know MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol*. 2001;62:620-31.

Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol*. 1999;60(4):323-30.

APÊNDICES

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ? F ?

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO

Nº..... APTO:

BAIRRO:

CIDADE

.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....)

.....

2. RESPONSÁVEL

LEGAL:.....

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador
etc.):.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ? F ?

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

.....

CEP:

TELEFONE:

DDD

(.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Profa. dra. Gilda Porta

CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto da Criança HC- FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

?	SEM RISCO	?	RISCO MÍNIMO	X	RISCO	MÉDIO
	RISCO BAIXO	?	RISCO MAIOR	?		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa de armazenamento de material biológico

Prezado(a) Senhor(a):

Seu filho(a) tem uma doença chamada Hepatite auto-imune (HAI). Ele(a) é acompanhado(a) e tratado(a) no grupo de Hepatologia do Instituto da Criança. Como a doença de seu filho(a) não é comum e os avanços nas pesquisas ainda estão em andamento, para melhor compreensão da doença, gostaríamos de colher sangue dele(a), juntamente com os outros exames que serão colhidos para o diagnóstico e controle. Este material será guardado em nosso laboratório, juntamente com outros materiais de pacientes que têm a mesma doença que seu filho(a), após a extração do DNA (material genético), com o intuito de serem realizadas algumas pesquisas no futuro sobre a suscetibilidade genética à doença. Esse material faz parte de um banco de material biológico que vem sendo coletado no Instituto da Criança desde sua aprovação pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), em agosto de 2000, utilizando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (CLTE) aprovado na época. Com esse material serão realizados estudos de como alguns genes do(a) seu filho(a) podem ser, em parte, responsáveis pelo desenvolvimento da doença.

O sangue será colhido com seringas e agulhas descartáveis, utilizados somente uma vez, de uma veia sob a pele, e em pequena quantidade. No local da picada da agulha poderá sentir um pouco de dor e, às vezes, ficar uma mancha roxa, que depois de vários dias sumirá sozinha. Se o senhor(a) não quiser que o sangue seja guardado, tem todo o direito de se recusar.

- 2. Desconfortos e riscos esperados:** A coleta de sangue será feita na veia sob a pele e em pequena quantidade. No local da picada da agulha poderá sentir um pouco de dor e, às vezes, ficar uma mancha roxa, que depois de vários dias sumirá sozinha. O desconforto esperado será muito pequeno e o risco será mínimo.
- 3. Benefícios que poderão ser obtidos:** O benefício a ser obtido em relação será em relação à doença que poderá trazer novas perspectivas ao conhecimento desta doença.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE

GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Nome : Dra. Gilda Porta

Endereço: Instituto da Criança – Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar , 647 CEP : 05403-900 SP.

Fone para contato:3069 8675

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Dados Clínicos dos pacientes com HAI													
n	Abrev.	RGHC	sexo	idade	IGA	IGM	IGG	IGE	nível IgE	HLA - DRB1	HLA DRB1	HLA-DRB3,4,5	HLA-DRB3,4,5
1	MCS	6012022E	F	1,5	<2	202	2410	NR		17	4	52	53
2	TCG	6031137H	F	5,9	59	112	2930	6	normal	11	7	53	0
3	KFM		F							4	10	53	0
4	PPG	6053771K	F	6,5	213	204	1950	NR	normal	10	7	53	0
5	SMO	2813137H	F	6,9	472	270	2850	102	normal	13	4	52	53
6	ECC	6036869K	F	12,8	497	248	6346	324	alto	16	13	51	52
7	RBS	6054631K	M	8,1	944	528	2198	NR		17	1	52	0
8	JDS	6039009A	F	11,2	436	160	5120	94	normal	15	13	51	52
9	FSA	6042066D	M	8,2	242	499	1320	862	alto	17	7	52	53
10	DRG	6036107C	F	4	NR	NR	NR	NR		12	7	52	53
11	PALM	2255391G	F						normal	17	13	52	0
12	VHL	6055211F	F	12,9	128	333	3062	NR		17	7	52	53
13	LCO	6041768A	F	3,7	69	767	1900	425	alto	1	7	53	0
14	DDS	6049927J	M	9,2	493	234	1809	1128	alto	13	0	52	0
15	FEMC	6024665E	M	12	352	164	2950	1110	alto	17	10	52	0
16	RLCH	6037580I	M	7,1	257	300	2430	210	alto	4	13	52	53
17	APOS	6020 85A	F	9,0	464	478	4580	60	normal	15	13	51	52
18	RMN	6026592D	F	10,7	530	560	1900	NR	normal	11	9	52	53
19	ALO	6042396E	F	4,0	133	198	3420	35	normal	7	17	52	53
20	ERS	2765348G	F	12,7	47	287	5300	781	alto	7	13	52	53
21	LCOR	6052418F	F	6,6	336	232	5524	NR		17	13	52	0
22	JPSA	6048054A	M	6,2	181	302	2014	NR		13	9	52	53
23	SSL	6054423I	M	10,2	255	308	5300	NR		13	4	52	53
24	ERM	6029634A	F	9,1	404	665	3738	117	alto	17	7	52	53
25	MOP	6037728K	F	6,3	614	468	7770	660	alto	13	14	52	0
26	IS	6016291K	F	7	460	920	2330	210	alto	13	7	52	53
27	BAM	6021120B	F	2,9	<32	358	2780	360	alto	7	10	53	0
28	MNV	6046689F	F	8,7	180	477	6230	110	alto	13	4	52	53
29	RASL	6039208F	M	9,7	276	302	3450	NR		13	4	52	53
30	ENC	6016901K	F	8	212	230	5280	NR		13	0	52	0
31	AIMF	3824GP	M	13,8	186	82	3087	NR		17	4	52	53
32	JCB	6056441C	F	6,9	145	115	2275	60	normal	11	7	52	53
33	COM	6038258F	F	5,5	110	166	5140	180	alto	13	7	52	53
34	ARA	6054482C	F	2,9	198	474	5300	35	normal	7	8	53	0
35	AGD	6050582C	F	11,0	417	276	2100			7	11	52	53
36	VCBG	6035915H	F	11,3	420	200	2520	129	normal	13	7	52	53
37	GNG	6049071K	F	6,7	204	119	1324	545	alto	13	0	52	0

Dados Clínicos dos pacientes com HAI													
n	Abrev.	RGHC	sexo	idade	IGA	IGM	IGG	IGE	nível IgE	HLA - DRB 1	HLA DRB1	HLA-DRB3,4,5	HLA-DRB3,4,5
38	HJBN	6028323K	F	3,3	15	290	6200	NR		7	15	53	0
39	IRO	6024017I	F	6	147	154	5300	NR		13	8	52	0
40	JASC	6030362A	F	4,9	186	140	2230	NR		4	12	52	53
41	RSM	6043167E	M						normal	15	7	51	53
42	EMNO	6043862D	F	9,7	497	402	4560	1130	alto	13	13	52	0
43	MEBF	6058305H	F	13,6	267	328	5235	49	normal	13	8	52	0
44	VR	6027678F	F	11,6	290	276	4100	NR		13	8	52	0
45	NRS	6057290F	F	3,9	NR	229	2390	27	normal	7	14	52	53
46	LGDN	4692	M	12						13	0	52	0
47	TA	6060997K	F	9,2	475	216	1628	38	normal	15	7	51	53
48	EG	6060999I	F	3	183	247	1363	25	normal	17	13	52	0
49	DABS	6060556J	F	9,8	376	184	3792	86	normal	13	4	52	53
50	RJ	6060586I	F	10	780	267	NR	NR		13	0	52	0
51	CFS	6059169K	F	6,9	171	261	6821	NR		17	13	52	52
52	JSA	6052517C	F	5,9	360	212	1696	1045	alto	16	13	51	52
53	BPO	6061624I	M	10,0	338	178	3586	118	normal	13	9	52	53
54	FAJ	6043410D	M	15,2	320	210	3200	760	alto	1	4	53	0
55	SCC	6063389J	F	8,9	351	435	4392	NR		11	13	52	0
56	SSBS	6055222B	F	6,6	117	562	3258	1	normal	1	8	0	0
57	IPE	6053431B	F	5,4	353	694	6100	1160	alto	17	7	52	53
58	ENS	6061469K	F	7,3	342	458	4341	650	alto	7	13	52	53
59	MDA	6063810I	F	13,5	408	739	4854	11	normal	15	4	51	53
60	CTN	2544414C	F	7,5	364	184	7736	137	normal	13	14	52	0
61	MCA	3122134G	F	12,7	211	258	3176	NR	normal	13	7	52	53
62	RQS	2702214I	F	6,4	227	370	4200	587	alto	13	17	52	0
63	FG	3171GP	F	3,6	135	230	1515	20	normal	15	13	51	52
64	BFR	6049126J	F	5,2	389	269	2658			7	13	52	53
65	RAI	6065411C	F	11,7	323	283	5033	92	normal	13	8	52	0
66	DGM	3869GP	F	1,6	128	210	1200	23	normal	1	7	53	0
67	MARR	6065029H	F	9,9	302	296	7764	2047	alto	17	13	52	0
68	FAA	6065995J	F	12,3	372	298	5780	65	normal	17	13	52	0
69	RFE	6061236I	F	1,3	101	91	2070	110	alto	7	8	52	53
70	NSP	6065511J	F	1,2	208	250	2316	65	normal	15	17	51	52
71	LGG	6066611A	M	7	99	160	898	NR	alto	16	13	51	52
72	JSA	6052517C	F	5,9	360	212	1696	1045		18	13	52	0
73	CPS	6064843C	F	10,3	108	130	3062	NR	normal	13	0	52	0
74	VML	6066734J	M	5,5	<77	229	6898	37	normal	15	13	52	51
75	MISN	6066534G	M	9	305	330	4870	136	alto	16	13	51	52
76	BFMP	6070888K	M	9,6	110	87	2430	516	alto	17	0	52	0
77	HIA	6065079D	F	9	317	223	1215	106	alto	13	10	0	52
78	GDi	3880GP	F	12,8	273	180	6000	520	alto	17	7	52	53
79	ADC	6071622E	M	11,6	338	163	5680	560	alto	17	1	52	0
80	ACO	3437GP	F	12,3	496	225	6410	NR		13	0	52	0

Dados Clínicos dos pacientes com HAI													
n	Abrev.	RGHC	sexo	idade	IGA	IGM	IGG	IGE	nível IgE	HLA - DRB1	HLA DRB 1	HLA-DRB3,4,5	HLA-DRB3,4,5
81	APB	6071761A	F	2,1	90	120	1200	NR	alto	13	17	52	0
82	KQS	6072674E	F	5	94	139	3080	182	alto	12	13	52	0
83	LLO	6072861C	F	11,7	363	260	4200	1930	alto	17	13	52	0
84	GSO	6075281F	M	10,6	200	117	5545	118		15	4	51	53
85	RRM	6073129H	F	10,7	671	269	3690	352	alto	13	13	52	0
86	FCSE	6073388E	M	1,5	63	250	2170	45	normal	13	7	52	53
87	APSO	6073722B	F	5,6	134	76	3118	131	alto	17	13	52	0
88	RPS	6074195H	M	10,3	NR	NR	NR	NR		13	7	52	53
89	HCO	6075281F	F	10,6	200	117	5545	118	alto	4	13	52	53
90	JASC	6076252I	F	9,4	312	284	5000	128	alto	1	13	52	0
91	MOA	6077356G	M	14,3	355	385	2602	305	alto	13	0	52	0
92	RCR	6064764K	F	12,7	271	252	3223	24	normal	13	0	52	0
93	PFV	CONS IRENE	M						normal	15	10	51	0
94	LPS	6078329H	F	4	61	131	4366	29	normal	11	13	52	0
95	VBSP	6081442A	F	5,2	123	228	1319	29		17	4	52	53
96	CJB	6082796I	F	11,9	158	296	2208	NR		13	7	52	53
97	CCSF	6083381F	F	2,1	245	229	2559	364	normal	11	13	52	0
98	TPG	6023266C	F							13	8	52	0
99	MAP	3302213H	F	12,1	360	288	4110	39	normal	1	13	52	0
100	TDOF	6081269G	M	7,5	64	143	992	29	normal	13	13	52	0
101	TCS	6067316C	F	3,3	160	240	1650		normal	4	14	52	53
102	DSF	6077513C	M	11	524	132	3706	132	normal	16	4	51	53
103	KPM	6102680H	F	6,7	71	111	1364	29	normal	17	7	52	53
104	JOS	3337822E	F							7	8	53	0
105	EJG	6106116A	F						alto	1	13	52	0
106	FFV	6089586G	M	8,8	NR	NR	NR	NR		17	13	52	0
107	SRGJ	6119440I	M	12,8	253	249	2223	274	alto	13	17	52	0
108	LSB	6090503G	F	3,4	115	84	1934	<17	normal	17	10	52	0
109	MMG	6113625J	M	11,5	183	169	3318	1185	alto	17	13	52	0
110	PHQ	GP4928	M	1,6	<6	65	727	18		7	0	53	0
111	MMP	6091724I	F	10,9	63	267	5308	38	normal	17	7	52	53
112	CRS	6109378B	F	2,9	287	21	5056	404	alto	13	7	52	53
113	JPS	6092634E	F	4,5	203	156	4387	1628	alto	15	13	51	52
114	ECUC	6111337E	F	10,1	NR	NR	NR	NR	alto	13	11	52	0
115	TPO	6094299J	F	7,7				143	alto	4	13	52	53
116	VAG	6093287I	F	10,9	152	481	4075	56	normal	15	13	51	52
117	SCNS	6094843G	F	11,7	513	288	3071	259	alto	13	10	52	0
118	MEMS	13551318D	F	8,5	314	293	4892	516	alto	17	13	52	0
119	APBC	6095060I	F	10,4	229	144	2320	474	alto	7	0	53	0
120	AFS	6095109C	F	8,9	0	225	5892	656	alto	1	17	52	0
121	WMS	6095903J	M	6,6	434	131	4016	2345	alto	11	13	52	0
122	VSJ	6098439K	M	14,1	65	220	2265	42	normal	13	14	52	0
123	LBDS	6092389H	F	4,6	157	177	3091	382	alto	13	16	51	52

Dados Clínicos dos pacientes com HAI													
n	Abrev.	RGHC	sexo	idade	IGA	IGM	IGG	IGE	nível IgE	HLA - DRB1	HLA DRB1	HLA-DRB3,4,5	HLA-DRB3,4,5
124	ASL	6098873K	M	5,7	286	81	6547	349	alto	13	0	52	0
125	PJT	6089777A	F	11,2	152	414	4096	146	normal	14	15	51	53
126	SSR	6101141I	F	12,3	447	147	3368	90	normal	4	17	52	53
127	DMS	6091238k	M	6,8	248	151	971	945	alto	13	16	51	53
128	YGV	6101683J	M	10,7	184	108	3135	158	alto	11	?	52	53
129	DFS	6101449B	M	12,9	NR	NR	NR	NR		4	7	53	0
130	FKO	6069242C	F	10,5	173	246	5210	142	normal	14	17	52	53
131	LHFC	6084531H	M	12,8	128	161	2380	127	normal	13	0	52	53
132	PSL	6097335B	F	6	268	205	5226	82	normal	1	13	52	0

Dados Clínicos dos pacientes com HAI									
n	Abrev.	RGHC	tipo HAI	auto Ac	AAN	AAML	AAA	AAM	AAMFR
1	MCS	6012022E	HAf-2	LKM	0	0		0	1280
2	TCG	6031137H	HAf-2	LKM	0	0	0	0	320
3	KFM		HAf-1						
4	PPG	6053771K	HAf-2	LKM	0	0	0	0	80
5	SMO	2813137H	HAf-1	AML	0	320	160	0	0
6	ECC	6036869K	HAf-1	AML	0	320	160	0	0
7	RBS	6054631K	HAf-1	AML+AAN	160	80	160	0	0
8	JDS	6039009A	HAf-1	AML+AAN	1280	320	160	0	0
9	FSA	6042066D	HAf-2	AML	0	0	0	0	320
10	DRG	6036107C	HAf-2	LKM	0	0	0	0	320
11	PALM	2255391G	HAf-2						
12	VHL	6055211F	HAf-1	AML	320	320	160	0	0
13	LCO	6041768A	HAf-1	AML	0	160	0		
14	DDS	6049927J	HAf-1	AML	0	80	160	0	0
15	FEMC	6024665E	HAf-1	AML	0	160	0	0	0
16	RLCH	6037580I	HAf-1	AML	0	80	160	0	0
17	APOS	6020 85A	HAf-1	AML	640	320	160	0	0
18	RMN	6026592D	HAf-1	AML	0	320	160		
19	ALO	6042396E	HAf-1	AML	320	160	160	0	0
20	ERS	2765348G	HAf-1	AML	0	80	160	0	0
21	LCOR	6052418F	HAf-1	AML	0	320	160	0	0
22	JPSA	6048054A	HAf-1	AML	NR	320	160	0	0
23	SSL	6054423I	HAf-1	AML	0	80	160	0	0
24	ERM	6029634A	HAf-1	AML	160	0	0	320	0
25	MOP	6037728K	HAf-1	AML	160	80	160	0	0
26	IS	6016291K	HAf-1	AML	0	160	0		0
27	BAM	6021120B	HAf-2	LKM	0	0		0	320
28	MNV	6046689F	HAf-1	AML	0	80	160	0	0
29	RASL	6039208F	HAf-1	AML	0	320	160	0	0
30	ENC	6016901K	HAf-1	AML	0	2560	160	0	0
31	AIMF	3824GP	HAf-1	AML	0	320	160	0	0
32	JCB	6056441C	HAf-2	LKM	0	0		0	320
33	COM	6038258F	HAf-1	AML	0	320	160	0	0
34	ARA	6054482C	HAf-2	LKM	0	0		0	320
35	AGD	6050582C	HAf-2	LKM	1280	0		0	320
36	VCBG	6035915H	HAf-1	AML+AAN	160	320	160	0	0
37	GNG	6049071K	HAf-1	AML+AAN	40	40	0	0	0
38	HJBN	6028323K	HAf-2	LKM	0		0	0	320
39	IRO	6024017I	HAf-1	AML	0	320	160	0	0
40	JASC	6030362A	HAf-2	LKM	0	0		0	320
41	RSM	6043167E	HAf-1						
42	EMNO	6043862D	HAf-1	AML	0	160	160	0	0
43	MEBF	6058305H	HAf-1	AML+AAN	200	320	160	0	0
44	VR	6027678F	HAf-1	AML	0	320	160	0	0
45	NRS	6057290F	HAf-2	LKM	0	0	0	0	320

Dados Clínicos dos pacientes com HAI									
n	Abrev.	RGHC	tipo HAI	auto Ac	AAN	AAML	AAA	AAM	AAMFR
46	LGDN	4692	HAf1	AML+AAN	1280	320	160	0	0
47	TA	6060997K	HAf2	LKM	0	0	0	0	320
48	EG	6060999I	HAf2	LKM	0	0	0	0	320
49	DABS	6060556J	HAf1	AML	0	320	160	0	0
50	RJ	6060586I	HAf1	AML	0	320	160	0	0
51	CFS	6059169K	HAf1	AML+AAN	100	320	160	0	0
52	JSA	6052517C	HAf1	AML	0	80		0	0
53	BPO	6061624I	HAf1	AML	0	320	160	0	0
54	FAJ	6043410D	HAf1	AML	0	320	0	0	
55	SCC	6063389J	HAf1	AML	0	320	160	0	0
56	SSBS	6055222B	HAf1	AAN	0	0	0	0	0
57	IPE	6053431B	HAf1	AML	0	80	160	0	0
58	ENS	6061469K	HAf1	AML	0	320	160	0	0
59	MDA	6063810I	HAf1	AML+AAN	640	320		0	0
60	CTN	2544414C	HAf1	AML+AAN	100	320	160	0	0
61	MCA	3122134G	HAf1	AML+AAN	320	320	160	0	0
62	RQS	2702214I	HAf1	AML	0	160	160	0	0
63	FG	3171GP	HAf2	LKM	0	0	0	0	320
64	BFR	6049126J	HAf2	LKM	0	320	40	0	320
65	RAI	6065411C	HAf1	AML	0	320		0	0
66	DGM	3869GP	HAf1	AML	0	320	160	0	0
67	MARR	6065029H	HAf1	AML+AAN	320	320	160	0	0
68	FAA	6065995J	HAf1	AML+AAN	1280	320	160	0	0
69	RFE	6061236I	HAf2	LKM	0	0	0	0	320
70	NSP	6065511J	HAf2	LKM	0	0	0	0	320
71	LGG	6066611A	HAf1	AML	0	320	160	0	0
72	JSA	6052517C	HAf1	AML	0	80		0	0
73	CPS	6064843C	HAf1	AML+AAN	640	320		0	0
74	VML	6066734J	HAf1	AML+AAN	160	320		0	0
75	MISN	6066534G	HAf1	AML+AAN	320	320		0	0
76	BFMP	6070888K	HAf1	AAN	160	0	0	0	0
77	HIA	6065079D	HAf1	AML+AAN	40	40		0	0
78	GDi	3880GP	HAf1	AML+AAN	5120	320	160	0	0
79	ADC	6071622E	HAf1	AML+AAN	40	320		0	0
80	ACO	3437GP	HAf1	AML+AAN	6400	320	160	0	0
81	APB	6071761A	HAf2	LKM	0	0		0	320
82	KQS	6072674E	HAf1	AML+AAN	320	320		0	0
83	LLO	6072861C	HAf1	AML+AAN	320	320		0	0
84	GSO	6075281F	HAf1	AML+AAN	320	320	160	0	0
85	RRM	6073129H	HAf1	AML	0	80		0	
86	FCSE	6073388E	HAf2	LKM	0	0		0	160
87	APSO	6073722B	HAf1	AML	0	40,0		0	0
88	RPS	6074195H	HAf1	AML	0	320		0	
89	HCO	6075281F	HAf1	AML+AAN	320	320	160	0	0
90	JASC	6076252I	HAf1	AML	0	320	160	0	0
91	MOA	6077356G	HAf1	AML+AAN	160	320		0	0

Dados Clínicos dos pacientes com HAI									
n	Abrev.	RGHC	tipo HAI	auto Ac	AAN	AAML	AAA	AAM	AAMFR
92	RCR	6064764K	HA1-1	AML	0	160		0	0
93	PFV		HA1-1						
94	LPS	6078329H	HA1-1	AAA	0	320		0	
95	VBSP	6081442A	HA1-1	AAN	160	0	0	0	0
96	CJB	6082796I	HA1-1	AML	0	320		0	0
97	CCSF	6083381F	HA1-1	AML	0	80		0	0
98	TPG	6023266C	HA1-2						
99	MAP	3302213H	HA1-1	AML+AA N	160	320	160	0	
100	TDOF	6081269G	HA1-1	AML+AA N	160	320			
101	TCS	6067316C	HA1-1	AML	0	320	320	0	0
102	DSF	6077513C	HA1-1	AML+AA N	160	320	160	0	0
103	KPM	6102680H	HA1-1		0			0	320
104	JOS	3337822E	HA1-2						
105	EJG	6106116A	HA1-1						
106	FFV	6089586G	HA1-1	AML+AA N	40	320	0	0	0
107	SRGJ	6119440I	HA1-1	AML	0	320	320	0	0
108	LSB	6090503G	HA1-2	LKM	40	0		0	320
109	MMG	6113625J	HA1-1	AAN	640	0,0	0	0	
110	PHQ	GP4928	HA1-1	AML	0	160		0	0
111	MMP	6091724I	HA1-1	AML+AA N	1280	320	320	0	
112	CRS	6109378B	HA1-1	AML+AA N	160	320		0	0
113	JPS	6092634E	HA1-1	AML	40	320	320	0	
114	ECUC	6111337E	HA1-1	AML	0	320		0	0
115	TPO	6094299J	HA1-1	AML	0	1/320	320	0	0
116	VAG	6093287I	HA1-1	AML	0	40	0	0	0
117	SCNS	6094843G	HA1-1	AML	0	320	320	0	
118	MEMS	13551318D	HA1-1	AML	0	80		0	0
119	APBC	6095060I	HA1-1	AML	0	320		0	0
120	AFS	6095109C	HA1-1	AML+AA N	320	320		0	0
121	WMS	6095903J	HA1-1	AML+AA N	40	320	320	0	0
122	VSJ	6098439K	HA1-2	LKM	0	0	0	0	320
123	LBDS	6092389H	HA1-1	AML	0	320	320	0	
124	ASL	6098873K	HA1-1	AML+AA N	640	320,0	320	0	
125	PJT	6089777A	HA1-1	AML+AA N	1/128 OPF	1/320			
126	SSR	6101141I	HA1-1	AML	160	0	0	0	0
127	DMS	6091238k	HA1-1		0	0	0	0	0
128	YGV	6101683J	HA1-1	AML	160	320	320	0	0
129	DFS	6101449B	HA1-1	AAN	320	0	0	0	0
130	FKO	6069242C	HA1-1	AML+AA N	160	320		0	0
131	LHFC	6084531H	HA1-1	AML+AA N	320	320	0	0	0
132	PSL	6097335B	HA1-1	AML	40	320	320	0	

Preparo de Reagentes

Acrilamida (29:1) 40%

Acrilamida	380g
Bisacrilamida	20g
H ₂ O	q.s.p. 1000ml

Brometo de dodeciltrimetilamônio 12% (DTAB)

DTAB	12 g
NaCl	13.15 g
Tris 2M pH 8	7.5 ml
EDTA 0.4M	7.5 ml
H ₂ O Milli Q q.s.p.	100 ml

Autoclavar e estocar em T° A

Brometo de hexadeciltrimetilamônio 5% (CTAB)

CTAB	5 g
NaCl 3M	13.33 ml
H ₂ O MilliQ qsp	100 ml

Autoclavar e estocar a T° A

Brometo de Etídio 10 mg/ml

brometo de etídio	1 g
H ₂ O Milli Q	100 ml

Guardar a 4°C ao abrigo de luz.

Desoxi-Nucleotídeos Trifosfato (dNTPs))

Desoxiadenosina trifosfato (dATP)	2,5 mM
Desoxicitosina trifosfato (dCTP)	2,5 mM
Desoxiguanidina trifosfato (dGTP)	2,5 mM
Desoxitimidina trifosfato (dTTP)	2,5 mM

EDTA 0,4M pH 8,0

EDTA	148,9 g
H ₂ O MilliQ	800 ml

Agitar, com aquecimento até 45⁰C. Ajustar para pH=8,0, com pastilhas de NaOH. Coletar volume 1000ml. Autoclavar.

Gel de poliacrilamida

Solução poliacrilamida 40% (29:1 acrilamida/bisacrilamida)	26,25ml
TBE 10x	10ml
APS (persulfato de amônia) 10%	250µl
TEMED	67µl

NaCl 3M

NaCl	175,2 g
H ₂ O Milli Q qsp	1000 ml

Autoclavar. Guardar a 4°C.

Persulfato de amônio (APS) 10%

APS	1g
H ₂ O	q.s.p. 10ml

Tampão Tris-EDTA ácido acético (TEA) 50X

Tris base	242 g
ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,4 M pH 8	125 ml
H ₂ O Milli Q qsp	1000 ml

Autoclavar. Guardar a 4°C.

Tampão de corrida - "Stop Mix"

glicerol	30%
azul de bromofenol	0,25%

Guardar a 4°C.

Tampão Tris-EDTA ácido bórico (TBE) 10X

Tris base	108 g
ácido acético glacial	55 g
EDTA 1,0mM pH 8	40ml 0,5M pH8,0
H ₂ O Milli Q qsp	500 ml

Autoclavar. Guardar a 4°C.