

LAYSA TOSCHI MARTINS

GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE – O MODELO DO VITILIGO

**DOUTORADO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE
PUCPR**

Curitiba

2018

LAYSA TOSCHI MARTINS

GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE – O MODELO DO VITILIGO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) como requisito à obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Ravanhol Frigeri

Curitiba

2018

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB – 9/1118

M386g
2018

Martins, Laysa Toschi
Genética da autoimunidade : o modelo do vitiligo / Laysa Toschi Martins ; orientador: Marcelo Távora Mira ; co-orientador: Henrique Ravanhol Frigeri. – 2018.
130 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2018
Bibliografia: f. 86-119

1. Vitiligo. 2. Autoimunidade. 3. Genética. I. Mira, Marcelo Távora. II. Frigeri, Henrique Ravanhol. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. – 616.55



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 30 dias do mês de outubro de 2018 às 08hs e 30min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE – O MODELO DO VITILIGO” apresentado por **Laysa Toschi Martins** para obtenção do título de Doutora; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Marcelo Távora Mira– Presidente – (PUCPR)	
Prof. Dr. Caio Cesar Silva de Castro– (PUCPR)	
Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR)	
Prof. Dr. Hélio Amante Miot– (UNESP)	
Prof. Dr. Flávio Alves Lara - (FIOCRUZ RJ)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira Conceito Aprovada
Prof. Dr. Caio Cesar Silva de Castro Conceito Aprovada
Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior Conceito Aprovada
Prof. Dr. Hélio Amante Miot Conceito Aprovada
Prof. Dr. Flávio Alves Lara Conceito Aprovada
Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

Dedico esta tese às pessoas que sempre
confiaram em mim:
aos meus avós *Ernesto e Rosemary*;
aos meus pais *Vinícius e Angela*;
ao meu noivo *Jonathan*.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pelo seu infinito amor, sempre cuidando de cada passo meu. Eu não teria chegado até aqui sem a Sua presença me animando e encorajando a prosseguir, dando-me a certeza que daria tudo certo no final.

Aos meus, pais *Angela* e *Vinícius*, e aos meus avós *Ernesto* e *Rose* por todo o apoio e incentivo a prosseguir. Sem o apoio de vocês eu certamente não estaria conquistando mais essa vitória. Obrigada pelo amor incondicional de vocês por mim, tento retribuir esse amor dando o meu melhor em tudo o que faço. Obrigada também por todas as orações que fizeram, e ainda fazem por mim. Obrigada por acreditar em mim!

Ao meu noivo *Jonathan*, por sempre ter acreditado, muitas vezes mais do que eu mesma, na minha capacidade. Muito obrigada, meu amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Marcelo T. Mira*. Sou muito grata a você por ter confiado em mim e aberto às portas de seu laboratório. Muito obrigada por todos seus ensinamentos, aprendi muito com você ao longo desses anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. *Henrique R. Frigeri*, com quem tive meu primeiro contato com a pesquisa, durante a iniciação científica. Obrigada por toda a paciência e tempo que investiu em mim, foram de fundamental importância na minha formação científica.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de realizar este estudo e por toda a infraestrutura disponível.

A CAPES pela bolsa oferecida.

A banca examinadora de qualificação e defesa, composta pelos professores *Vanessa Santos Sotomaior, Cleber Machado de Souza, Caio César Silva de Castro, Hélio Amante Miot e Flavio Alves Lara*, pelo aceite em ler e avaliar meu estudo.

Aos todos os meus colegas de laboratório e funcionários, que também são responsáveis por grande parte dos meus conhecimentos. Agradeço a todos vocês:

Alana Mazzetti, Alessandro Aforнали, Geison Cambri, Helena Regina Salomé D'Espindula, Irenice Cairo, Jane Fabia Domenica, Meire S. B. Fernandes, Monica Dallmann, Priscila Uaska Sartori, Rafael Saraiva de Andrade, Sérgio Fontoura.

As alunas de iniciação científica, *Carolina Giembra, Thayná Ratzke e Juliana da Silva Wroblewski* que me auxiliaram em parte dos experimentos.

A todos os pacientes e seus familiares que concordaram em participar voluntariamente da pesquisa científica.

RESUMO

O vitiligo é uma doença pigmentar adquirida e multifatorial caracterizada por uma perda progressiva de melanócitos. As razões que levam a danos nos melanócitos e seu posterior desaparecimento na pele ainda não foram totalmente elucidadas. Diversas hipóteses têm sido investigadas; dentre elas, a mais explorada pelos pesquisadores prevê uma base autoimune para a doença. Dentre as evidências que suportam essa teoria está a frequente ocorrência de outras doenças autoimunes com o vitiligo. Além disso, vários *loci* associados ao vitiligo abrigam genes que codificam para moléculas que possuem um papel importante no controle da imunidade. Simetricamente, diversos estudos genéticos envolvendo doenças autoimunes têm identificado associações genéticas em comum entre elas e com o vitiligo. Nossa hipótese é de que o vitiligo pode ser utilizado como modelo para o estudo do componente genético envolvido no controle dos processos de autoimunidade. Para testar essa hipótese, este estudo investigou os genes *CYP27B1*, *REL*, *TNFAIP3* e *IL2/IL21*, todos previamente relacionados com doenças autoimunes associadas ao vitiligo, quanto a sua possível associação com a doença pigmentar. O estudo foi realizado utilizando-se duas amostras populacionais independentes de desenho distinto: uma amostra de descoberta, baseada em famílias composta por 211 trios; e uma amostra de replicação formada por 131 casos e 119 controles. Um total de 15 marcadores genéticos fornecendo cobertura física completa dos genes candidatos foram genotipados em plataforma baseada em fluorescência de alto rendimento *ABI 7500* ou *Thermo-Life QuantStudio 7 Flex*. Análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de desequilíbrio de transmissão (para a população de famílias) e técnicas de regressão logística multivariada. Como resultados, foram encontrados sinais de associação com significância estatística entre os marcadores rs6545836 do gene *REL* ($P=0,01$; $OR=0,55$ (0,34-0,90)) e rs2069763 do gene *IL2* ($P=0,03$; $OR=0,66$ (0,43-1,00)) na população de famílias. Ambos os sinais de associação se concentraram entre pacientes com comorbidade autoimune e forma clínica não-segmentar, condizente com a nossa hipótese. Evidência de validação foi detectada para o rs2069763 na amostra populacional caso-controle ($P=0,028$; $OR=0,37$ (0,15-0,90)). Nossos achados sugerem os genes *REL* e *IL2* como novos *loci* candidatos na suscetibilidade ao vitiligo e reforçam a hipótese de um mecanismo genético compartilhado que controla o vitiligo e outras doenças autoimunes.

Palavras-chave: Autoimunidade. Vitiligo. Genética.

ABSTRACT

Vitiligo is an acquired, multifactorial pigmentary disease characterized by progressive loss of melanocytes. The reasons leading to melanocyte damage and its subsequent disappearance of the skin have not been fully elucidated and several hypotheses have been investigated; among them, the most explored by researchers assumes an autoimmune basis for the disease. Supporting this hypothesis is the frequent co-occurrence of autoimmune diseases with vitiligo. In addition, various genetic loci associated with vitiligo harbor key immune response genes. Symmetrically, genetic studies involving autoimmune pathologies have identified variants also associated with vitiligo. Our hypothesis is that vitiligo can be used as a model for the study of the genetic component controlling autoimmunity. To test this hypothesis, we investigated for association between vitiligo and genes *CYP27B1*, *REL*, *TNFAIP3* and *IL2/IL21*, all previously related to autoimmune diseases associated with vitiligo. The study was performed using two independent population samples: a discovery, family-based set of 211 trios and a replication set of 131 cases and 119 controls. A total of 15 genetic markers providing complete physical coverage of the candidate genes were genotyped using fluorescence-based platforms ABI 7500 or Thermo-Life QuantStudio 7 Flex. Statistical analysis was performed using the transmission disequilibrium test (for the family-based population) and multivariate logistic regression techniques. Statistically significant association with vitiligo was detected between rs6545836 of the *REL* gene ($P=0,01$; $OR=0,55$ (0,34-0,90)) and rs2069763 of the *IL2* gene ($P=0,03$; $OR=0,66$ (0,43-1,00)) in the family-based sample. Both association signals were concentrated among patients displaying autoimmune comorbidity and non-segmental vitiligo, consistently with our hypothesis. Evidence for validation was detected for rs2069763 in the case-control sample ($P=0,028$; $OR=0,37$ (0,15-0,90)). Our findings suggest *REL* and *IL2* as new vitiligo susceptibility genes and reinforce the hypothesis of a shared genetic mechanism controlling vitiligo and other autoimmune diseases.

Key-words: Autoimmunity. Vitiligo. Genetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da prevalência mundial estimada.	25
Figura 2 - Representação fotográfica das duas principais formas clínicas do vitiligo. ...	27
Figura 3 - Fluxograma do desenho geral do estudo.	36
Figura 4 . Fluxograma da estratégia stepwise de seleção de genes candidatos.....	40
Figura 5 . Fluxograma da estratégia stepwise de seleção de genes candidatos e resultados obtidos.	45
Figura 6 - Exemplo de perfil de discriminação alélica e de gráfico de amplificação para o marcador rs13031237 do gene <i>REL</i>	49
Figura 7 - Análise do desequilíbrio de ligação dos marcadores do gene <i>REL</i>	53
Figura 8 - Análise do desequilíbrio de ligação dos marcadores do gene <i>TNFAIP3</i>	57
Figura 9 - Análise do desequilíbrio de ligação dos marcadores do gene <i>IL2</i>	60
Figura 10 - Análise do desequilíbrio de ligação dos marcadores do gene <i>IL21</i>	62
Figura 11 - Mecanismo da relação do gene <i>CYP27B1</i> com a vitamina D.	67
Figura 12 - Expressão gênica associada às respostas imunes e autoimunidade mediada pelas proteínas c-Rel e A20.	70
Figura 13 - Desenho esquemático da localização genômica do gene <i>REL</i> e das variantes analisadas no presente estudo.....	70
Figura 14 - Relação da IL2 na expansão e diferenciação de células T.	73
Figura 15 - Funções exercidas pela IL21.....	73
Figura 16 - Desenho esquemático da localização genômica dos genes <i>IL2</i> e <i>IL21</i> e das variantes analisadas no presente estudo.	74
Figura 17 - Ilustração da interação entre os 30 genes associados à doenças autoimunes frequentemente relacionadas ao vitiligo	80
Figura 18 - Ilustração da interação entre os 5 genes candidatos testados.....	81
Figura 19 . Representação esquemática do possível mecanismo de interação entre <i>REL</i> e <i>IL2</i> na resposta imune contra o melanócito.....	82

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 - <i>Loci</i> identificados em GWAS em vitiligo.	32
Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos filhos afetados da população baseada em família e casos de pacientes com vitiligo da população caso-controle.	39
Tabela 2 - Protocolo padronizado para os ensaios de genotipagem.	42
Tabela 3 - Condições de amplificação nas plataformas <i>ABI 7500 polarized fluorescence TaqMan assay</i> ou <i>Thermo-Life QuantStudio 7 Flex</i>	42
Tabela 4 - Relação dos genes associados as doenças autoimunes frequentemente relacionadas ao vitiligo.	46
Tabela 5 - Identificação dos marcadores selecionados para o estudo.	48
Tabela 6 - Análise de associação do polimorfismo rs4646536 do gene <i>CYP27B1</i> com o vitiligo per se.	50
Tabela 7 - Associação dos marcadores do gene <i>CYP27B1</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.	50
Tabela 8 - Porcentagem de genotipagem obtida e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos <i>SNPs</i> rs6545836, rs842648, rs13031237 e rs842647 do gene <i>REL</i>	51
Tabela 9 - Análise de associação dos polimorfismos rs6545836, rs842648, rs13031237 e rs842647 do gene <i>REL</i> com o vitiligo per se.	52
Tabela 10 - Associação dos marcadores do gene <i>REL</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.	52
Tabela 11 - Haplótipo das variantes do gene <i>IL2</i>	54
Tabela 12 - Porcentagem de genotipagem obtida e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos <i>SNPs</i> rs5029930, rs610604 e rs582757 do gene <i>TNFAIP3</i>	55
Tabela 13 - Análise de associação dos polimorfismos rs5029930, rs610604 e rs582757 do gene <i>TNFAIP3</i> com o vitiligo per se.	55
Tabela 14 - Associação dos marcadores do gene <i>TNFAIP3</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.	56
Tabela 15 - Porcentagem de genotipagem obtida e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos <i>SNPs</i> do gene <i>IL2</i>	57

Tabela 16 - Análise de associação dos polimorfismos do gene <i>IL2</i> com o vitiligo per se.	58
Tabela 17 - Associação dos marcadores do gene <i>IL2</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.	59
Tabela 18 - Haplótipo das variantes do gene <i>IL2</i>	60
Tabela 19 - Porcentagem de genotipagem obtida e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos <i>SNPs</i> do gene <i>IL21</i>	60
Tabela 20 - Análise de associação dos polimorfismos do gene <i>IL21</i> com o vitiligo per se.	61
Tabela 21 - Associação dos marcadores do gene <i>IL21</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.	61
Tabela 22 - Análise de associação entre marcadores dos genes <i>REL</i> , <i>TNFAIP3</i> e <i>IL2</i> para o modelo dominante na população de replicação do tipo caso-controle.	63
Tabela 23 - Associação dos marcadores do gene <i>REL</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.	64
Tabela 24 - Associação dos marcadores do gene <i>TNFAIP3</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.	65
Tabela 25 - Associação dos marcadores do gene <i>IL2</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.	65
Tabela 26 - Haplótipo das variantes rs6545836 do gene <i>REL</i> e rs2069763 do gene <i>IL2</i>	78

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: Aprovação no comitê de ética em pesquisa.....	120
ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	122
ANEXO III: Método de extração de DNA genômico.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH)₂D₃ - 1,25-dihidroxitamina D₃

25OHD - 25-hidroxitamina D

a.C. – Antes de Cristo

ACE - em inglês, *Angiotensin I Converting Enzyme gene*

AHSA2 – em inglês, *Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 2 gene*

AIRE - em inglês, *Autoimmune Regulator gene*

AR - Artrite Reumatoide

BCHE – em inglês, *Butyrylcholinesterase gene*

C12orf10 – em inglês, *chromosome 12 open reading frame 10 gene*

C1QTNF6 - em inglês, *C1q and tumor necrosis factor related protein 6 gene*

CAT – em inglês, *Catalase gene*

CD4 – em inglês, *CD4 molecule gene*

CDH1 - em inglês, *cadherin 1 gene*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CLEC11A – em inglês, *C-type lectin domain family 11 member A gene*

COMT – em inglês, *Cathechol-O-methyltransferase*

CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CTLA4 - em inglês, *cytotoxic T- lymphocyte-associated protein 4 gene*

CYP27B1 – em inglês, *cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1*

DA – Doença Autoimune

DBP - proteína de ligação da vitamina D (em inglês, *Vitamin D Binding Protein*)

DDR1 - em inglês, *Discotin domain receptor tyrosine kinase 1 gene*

DL - Desequilíbrio de Ligação

DM1 - *Diabetes mellitus* tipo 1

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra-acético

FA - Frequência alélica

FAM - Sonda marcada com fluoróforo denominado FAM

FBAT – Teste de Associação Baseada em Família (em inglês, *Family-Based Association Test*)

FH – Frequência do Haplótipo

FI - Famílias Informativas

GWAS – Estudo do genoma completo (em inglês, *Genome Wide Association Study*)

GZMB – em inglês, *Granzyme B gene*

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HLA - Antígenos Leucocitários Humanos (em inglês, *Human Leucocyte Antigen*)

HSP – Proteína de choque térmico (em inglês, *Heat Shock Protein*)

HWE - Equilíbrio de Hardy-Weinberg (em inglês, *Hardy-Weinberg Equilibrium*)

IC - Intervalo de Confiança

IL2 – Interleucina 2

IL4 – Interleucina 4

IL7 – Interleucina 7

IL9 – Interleucina 9

IL15 – Interleucina 15

IL21 – Interleucina 21

IL-2R - receptor de IL-2

IL2RA - em inglês, *interleukin 2 receptor alpha gene*

LES - Lupus Eritematoso Sistêmico

LPP - em inglês, *LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma gene*

MAF – Frequência Alélica Mínima (em inglês, *Minor Allele Frequency*)

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (em inglês, *Major Histocompatibility Complex*)

NB-UVB - Raios ultravioletas B de banda estreita

NF-κB – Fator Nuclear kappa B (em inglês, *Nuclear Factor kappa B*)

ng - nanograma

NK - Células exterminadoras naturais (em inglês, *Natural Killer*)

nm – nanômetro

OMIN – em inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*

OR – Taxa de risco (em inglês, *Odds Ratio*)

pb – Pares de Base

PPGCS – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

PTPN22 - em inglês, *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 gene*

PUCPR - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

PUVA - Raios ultravioletas A com psoraleno

PVT1 - Pvt1 oncogene

REL - em inglês, *REL proto-oncogene, NF-kB subunit gene*

REER - em inglês, *Arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats gene*

RIP – Proteína Interativa do Receptor (em inglês *Receptor Interactive Protein*)

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (em inglês, *Reactive Oxygen Species*) -

rs – em inglês, *Reference SNP number*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SMM – Super Master Mix

SNP– Polimorfismo de Nucleotídeo de base única (em inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*)

SOD - Superóxido dismutase

STAT4 - em inglês, *Signal transducer and activator of transcription 4 gene*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR - Receptor de células T (em inglês, *T-cell receptor*)

TDT - Teste de Desequilíbrio de Transmissão

Th1 – Linfócitos T auxiliares 1 (em inglês, *T helper 1 cells*)

TKM – Tampão TRIS-KCl-MgCl₂

TNF – Fator de Necrose Tumoral (em inglês, *Tumor Necrosis Factor*)

TNFAIP3 - em inglês, *TNF alpha induced protein 3*

TNIP1 – em inglês, *TNFAIP3 interacting protein 1 gene*

TRAFs - Fatores Associados ao Receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF) (em inglês, *TNF receptor associated factor*)

Treg – Células T reguladoras

TYR – em inglês, *Tyrosinase gene*

UBASH3A - em inglês, *Ubiquitin associated and SH3 domain containing A gene*

UVA - Raios ultravioletas A

UVB – Raios ultravioletas B

VETF – em inglês, *Vitiligo European Task Force*

VIC – Sonda marcada com fluoróforo denominado VIC

VNS - Vitiligo Não Segmentar

VS - Vitiligo Segmentar

ZMIZ1 – em inglês, *Zinc finger MIZ-type containing 1 gene*

µL – microlitro

% Gen – Porcentagem de Genotipagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Genética de doenças complexas	19
1.1.1 Estudos observacionais de genética epidemiológica	19
1.1.2 Estudos de ligação	20
1.1.3 Estudos de associação	20
1.2 Doenças Autoimunes.....	22
1.2.1 Genética de doenças autoimunes	22
1.3 Vitiligo	23
1.3.1 Definição	23
1.3.2 Histórico	24
1.3.3 Epidemiologia.....	24
1.3.4 Formas Clínicas	26
1.3.5 Tratamento.....	27
1.3.6 Etiologia	28
1.3.7 Genética da suscetibilidade ao vitiligo.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivos gerais	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 METODOLOGIA	36
4.1 Desenho geral do estudo.....	36
4.2 Considerações éticas.....	37
4.3 Amostras populacionais.....	37

4.3.1 População de famílias	38
4.3.2 População Caso-controle	38
4.4 Extração de DNA	39
4.5 Seleção dos genes candidatos	40
4.6 Seleção dos marcadores	41
4.7 Genotipagem	41
4.8 Análise estatística	43
4.9 Previsão de impacto funcional	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Genes candidatos selecionados	45
5.2 Marcadores selecionados	48
5.3 Análise geral da genotipagem por taqMan®.....	48
5.4 Análise de associação baseada em família	50
5.4.1 <i>CYP27B1</i>	50
5.4.2 <i>REL</i>	51
5.4.3 <i>TNFAIP3</i>	54
5.4.4 <i>IL2</i>	57
5.4.5 <i>IL21</i>	60
5.5 Análise de associação caso-controle.....	63
6 DISCUSSÃO	66
6.1 <i>CYP27B1</i>	66
6.2 <i>REL</i>	68
6.3 <i>TNFAIP3</i>	71
6.4 <i>IL2</i> e <i>IL21</i>	71

6.5 Análise de associação caso-controle.....	74
6.6 Vitiligo como modelo de autoimunidade	75
6.7 Análise de interação gênica.....	77
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
8 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO I: APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	120
ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	122
ANEXO III: MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	128

1 INTRODUÇÃO

1.1 GENÉTICA DE DOENÇAS COMPLEXAS

O termo “doenças complexas” pode ser aplicado a doenças que são influenciadas por vários fatores, entre eles, fatores genéticos. Sob esta perspectiva, essas doenças são caracterizadas por não seguirem um padrão de herança mendeliana clássica, ou seja, não há uma relação direta entre o genótipo e o fenótipo observado (1). Dentre as características que diferenciam as doenças genéticas complexas das mendelianas estão: i) a existência de variação na gravidade dos sintomas e na idade de início da doença, dificultando assim a definição de um fenótipo apropriado e na seleção de uma amostra populacional ideal; ii) variação no mecanismo etiológico da doença, envolvendo diversas vias biológicas; iii) as doenças complexas são normalmente oligogênicas ou poligênicas, com cada gene contribuindo para uma fração do risco relativo total (2). Assim, o envolvimento de diversos genes, fatores ambientais e a interação entre eles dificulta o estudo da etiologia de doenças genéticas complexas. Para superar as barreiras e buscar pelos fatores de risco para essas doenças, diversas ferramentas podem ser utilizadas, dentre elas estão estudos observacionais de genética epidemiológica, estudos de ligação e de associação.

1.1.1 Estudos observacionais de genética epidemiológica

Idealmente, para se avançar no entendimento da etiologia de uma doença genética complexa, devem ser primeiramente realizados estudos a fim de se identificar a presença ou não de um componente genético, medindo sua herdabilidade e buscando pela existência ou não de um padrão de herança ao longo de famílias e populações (3). Um dos métodos empregados para avaliar os efeitos genéticos e ambientais de determinada doença são os estudos baseados na comparação da concordância fenotípica entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos (4). Sabendo do compartilhamento genético existente entre gêmeos monozigóticos, uma concordância fenotípica maior entre

estes quando comparado com os dizigóticos seria sugestivo da presença de um componente genético (4).

Sabendo da existência do componente genético na etiologia de determinada doença, pode-se, utilizando-se informações de famílias, determinar qual o modelo de herança de determinado fenótipo. Para isso, são realizadas análises de segregação complexas, que usam modelos matemáticos visando encontrar um padrão de herança que melhor se ajuste aos dados observados nas famílias (3).

Finalmente, para então se buscar pela contribuição dos genes e variantes genéticas envolvidas nas doenças complexas, estudos moleculares podem ser realizados, como os estudos de ligação e associação.

1.1.2 Estudos de ligação

O princípio dos estudos de ligação baseia-se na premissa de que, se um marcador polimórfico está próximo ao *locus* onde está localizado o gene que predispõe a determinada doença, eles irão co-segregar nas famílias ao longo das gerações, de maneira divergente ao esperado dentro da hipótese de transmissão aleatória de *loci* que não estão fisicamente ligados (2). Sendo assim, esses estudos fazem uso de famílias com o intuito de verificar a co-segregação de um marcador genético e um fenótipo, visando estabelecer se há uma ligação física entre o marcador e a característica analisada (5).

1.1.3 Estudos de associação

Diferente da análise de ligação, que permite uma ampla busca por todo o genoma de *loci* ligados à determinada característica baseados em suas localizações cromossômicas, os estudos de associação têm como objetivo identificar variantes genéticas que modifiquem o controle da suscetibilidade de determinada doença (5). Análises de associação podem ser realizadas utilizando-se principalmente de dois formatos de desenho de estudos: baseado em populações e baseado em famílias (3).

Os estudos baseados em populações comparam as frequências alélicas de determinado marcador genético obtidas em dois grupos diferentes: aqueles afetados pela doença (casos) e indivíduos não afetados (controles). Como resultado, um alelo é dito associado à determinada doença caso sua frequência seja maior em um dos grupos analisados (6). Já os estudos baseados em família analisam trios formados pelos pais e um filho afetado pela doença. Para essa análise, utiliza-se o Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) para verificar a frequência na qual determinado alelo é transmitido de um pai com genótipo heterozigoto para o filho afetado. Um desvio na transmissão aleatória dos alelos de acordo com a primeira lei de Mendel sugere associação (6).

Os estudos baseados em famílias oferecem vantagens quando comparado aos estudos do tipo caso-controle, dentre elas a proteção em relação à estratificação populacional que pode ocorrer entre casos e controles(7). Por outro lado, por necessitar de ao menos um pai heterozigoto, variações genéticas com uma frequência alélica baixa podem ocasionar a perda no número de famílias informativas e, como consequência, uma redução no poder estatístico da análise (8).

Sinais positivos de associação podem ocorrer devido a três principais motivos: i) associação ao acaso; ii) idealmente, uma associação direta, na qual o alelo associado é de fato o causador da doença; iii) como motivo mais frequente, uma associação indireta, na qual a variante associada não é a causal, mas está em desequilíbrio de ligação (DL) com a variante causal (3). O desequilíbrio de ligação pode ser definido como uma associação não aleatória de alelos em diferentes *loci* dentro de uma população (9). Esse fenômeno descreve, portanto, a relação entre genótipos em um par de sítios polimórficos (10). As duas principais medidas do DL são o D' e o r^2 , com valores variando entre 0 e 1 (11). O D' , também chamado de “probabilidade de associação”, é uma medida para a identificação de regiões nas quais há pouca recombinação (6). Um valor de D' igual a 1 indica um completo DL, ou seja, a ausência de recombinação entre os dois marcadores genéticos (6). Para determinar a força do DL, utiliza-se o parâmetro de r^2 , o quadrado do coeficiente de correlação entre a frequência alélica em dois *loci* (6). Valores de r^2 superiores a 0,8 indicam um alto DL entre duas variações genéticas, sendo que valores iguais a 1 indicam um perfeito DL, ou seja, dois *SNPs* (do inglês – *Single nucleotide polymorphisms*) capturam a mesma informação (10). Quando essas variantes não sofrem

recombinação dentro das gerações, esse desequilíbrio de ligação persiste e os alelos serão herdados em haplótipos, ou seja, segregarão como uma unidade (12).

Embora o genoma apresente milhões de variações genéticas, seu mapeamento físico completo se tornou possível através dos estudos de genoma completo, *GWAS* (do inglês – *Genome-wide association study*). Esses estudos baseiam-se no conceito de DL para selecionar marcadores genéticos representativos de um conjunto de outros marcadores associados a estes, denominados então, *Tag SNPs*. Com isso, os *GWAS* possibilitam testar centenas de milhares de *SNPs* buscando por associações com condições clínicas complexas, incluindo as doenças com componente autoimune (13).

1.2 DOENÇAS AUTOIMUNES

Doenças autoimunes surgem a partir da perda da tolerância fisiológica a autoantígenos, tendo sido identificadas mais de 80 doenças com essa característica, como o *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), a Artrite Reumatoide (AR) e o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (14). A maioria das doenças autoimunes é multifatorial, envolvendo tanto fatores ambientais como genéticos (15). Fatores ambientais como infecções, exposição a raios ultravioletas, nutrição e estresse físico e psicológico contribuem para o surgimento destas doenças (16). No entanto, estudos clássicos, como os realizados com gêmeos, indicam a existência de fatores genéticos associados a doenças autoimunes, uma vez que há maior concordância de ocorrência destas doenças em gêmeos monozigóticos quando comparados aos dizigóticos (4). Sendo assim, a genética pode ser considerada parcialmente responsável pelo controle da suscetibilidade a doenças autoimunes (17).

1.2.1 Genética de doenças autoimunes

Associações entre variações genéticas e doenças autoimunes foram, primeiramente, identificados na década de 1970. Estas variações foram localizadas na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*MHC*, em inglês, *Major Histocompatibility Complex*), que codifica para os Antígenos Leucocitários Humanos (*HLA*, em inglês, *Human Leucocyte Antigen*) (18). Mais recentemente, estudos genômicos

de larga escala, como os GWAS, demonstraram associação de certas doenças autoimunes a diversos polimorfismos em genes que codificam para moléculas que possuem um importante papel na imunidade, tais como: citocinas, moléculas de sinalização para células B, moléculas de sinalização intracelular, fatores de transcrição e receptores de superfície celular (19). Desta forma, há um forte indício da contribuição destes genes e suas variações no desenvolvimento de doenças autoimunes.

1.3 VITILIGO

1.3.1 Definição

O vitiligo é uma doença pigmentar caracterizada pela perda progressiva de melanócitos, predominantemente encontrados na camada basal da epiderme, bem como na matriz do folículo capilar, levando à diminuição ou ausência de melanina em certas áreas da pele (20, 21). Pelo fato das manchas resultantes do vitiligo normalmente ocorrerem em regiões expostas do corpo, como face e mãos, esta desordem apresenta um alto impacto na autoestima do paciente, sendo considerada uma doença com um grande efeito deletério psicológico (20).

Vários fatores podem agir de forma isolada ou em conjunto para o desenvolvimento da doença, incluindo o estresse psicológico, traumas, exposição a raios solares, infecções, e estresse oxidativo (22). Também foi verificada uma ocorrência concomitante entre o vitiligo e diversas doenças autoimunes; além disso, estudos identificaram *loci* genéticos compartilhados entre essas doenças (23), sugerindo o envolvimento de um componente genético e autoimune na etiologia da doença. Foi proposto que o vitiligo apresente um modo de herança poligênico, com penetrância incompleta e expressão variável, também apresentando um histórico familiar positivo (24).. Além disso, um estudo realizado com 815 chineses portadores de vitiligo e seus familiares, identificou uma herdabilidade de aproximadamente 55% (25).

1.3.2 Histórico

Os primeiros relatos de doenças de pele com características semelhantes às do vitiligo datam de aproximadamente 1500 a.C. (26). Tanto textos pré-Hindu Védicos quanto antigos textos egípcios apresentam registros claros de máculas despigmentadas de pele (27). O *Papiro de Ebers* faz menção a duas doenças de pele, a primeira pode ser interpretada como a hanseníase, acompanhada da recomendação *thou shalt not do anything to it* (do inglês, “não há nada que possa ser feito para isso”). Já a outra doença parece caracterizar o vitiligo, como uma simples falta de pigmentação (26). Existem também diversas referências no antigo testamento aos termos *Zoráat* ou *Tzaraat* (em hebraico clássico, manchas brancas), porém existe uma controvérsia quanto ao fato dessa doença ser, realmente, o vitiligo (2).

A palavra “vitiligo” foi, primeiramente, utilizada por Aulus Cornelius Celsus em seu tratado clássico “*De Medicina*”. Porém, foi apenas no século 19 que o vitiligo teve a sua primeira descrição histopatológica pelo dermatologista húngaro Moritz Kaposi, o qual estabeleceu que a única mudança anatômica na pele de pessoas portadoras de vitiligo é a falta de grânulos de pigmentos em células epidérmicas profundas (26).

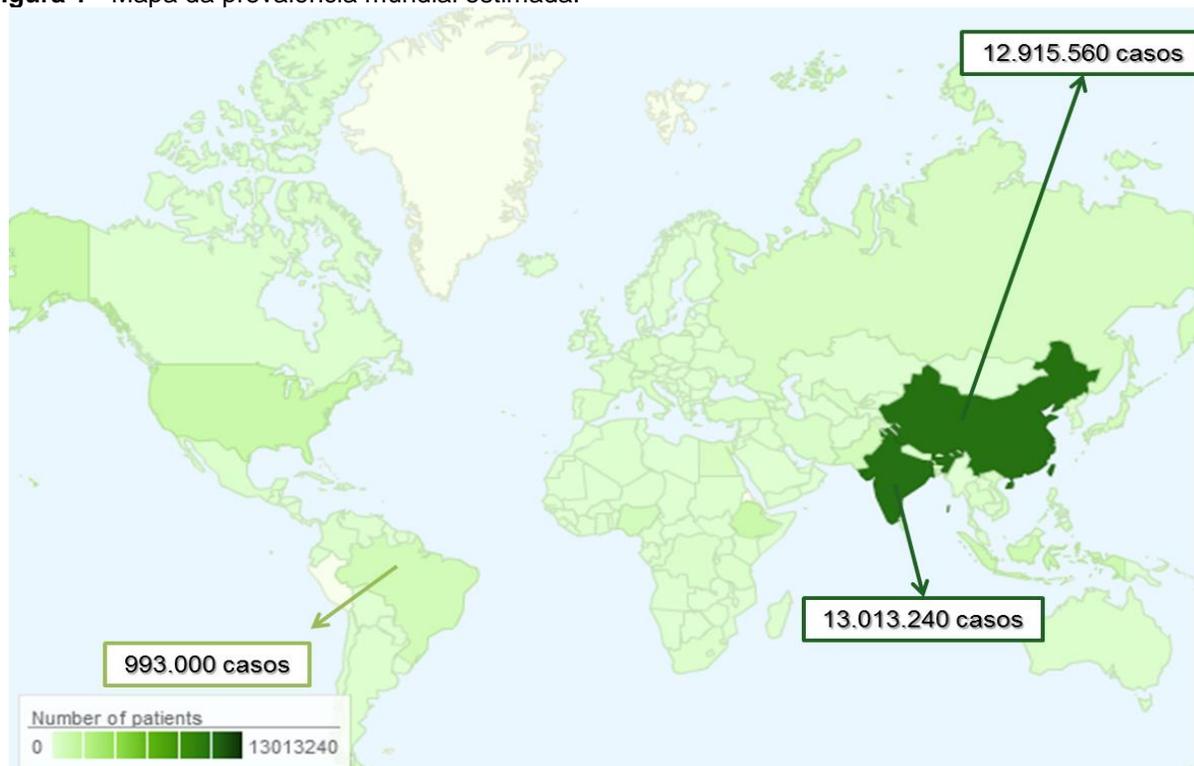
1.3.3 Epidemiologia

A prevalência do vitiligo varia de 0,06% até 1,5% entre países, afetando ambos os sexos na mesma proporção (28, 29). Pelo fato do vitiligo ser uma doença que não requer notificação obrigatória em nenhum país, os níveis de incidência e prevalência da doença são mal compreendidos, dependendo, muitas vezes, de estudos epidemiológicos acadêmicos independentes. Para melhor entender a prevalência mundial do vitiligo, a Fundação de pesquisa do Vitiligo (*Vitiligo Research Foundation*) reuniu dados de estudos epidemiológicos na construção de um mapa que mostra a doença concentrada na China e Índia (Figura 1). Já no Brasil, um estudo populacional realizado com cerca de 17.000 brasileiros identificou uma prevalência variando entre 0,46 e 0,68% (30).

A taxa de incidência pode atingir índices elevados, de 8,8% na Índia (31). Além disso, não é observada uma diferença nos índices de ocorrência de acordo com a etnia,

e cerca de metade dos pacientes desenvolvem a doença antes dos vinte anos de idade (20). Com relação ao histórico familiar, foi observado que indivíduos que possuem parentes de primeiro ou segundo grau afetados apresentam riscos relativos significativamente maiores quando comparados com a população em geral (32). Além disso, a idade média do início do vitiligo foi inferior nas famílias com histórico dessa doença, sendo essa uma característica clássica de um traço poligênico (32).

Figura 1 - Mapa da prevalência mundial estimada.



Fonte: Adaptado de <<http://vrfoundation.org/map>> com modificações.

Estudo realizado com 1.098 pacientes caucasianos com vitiligo relatou que 20% deles foram afetados por pelo menos uma doença autoimune adicional; a maioria dos pacientes apresentou Tireoidite de Hashimoto (12,9%), seguido por alopecia areata (3,8%), anemia perniciosa (0,5%) e LES (0,3) (24). Outro estudo, realizado com cerca de 1.800 pacientes de origem caucasiana, revelou que 19,4% dos indivíduos com vitiligo apresentaram também um histórico clínico de doenças autoimunes da tireoide. Além disso, dentre os 8.034 parentes de primeiro grau dos pacientes com vitiligo, 5,7% reportaram apresentar doenças da tireoide (33). Uma proporção diferente foi identificada

em um estudo realizado com cerca de 6.000 pacientes com vitiligo de origem chinesa. Nesse estudo apenas 7,7% dos pacientes apresentou alguma doença autoimune, sendo a mais prevalente a artrite reumatoide (2,2%), também sendo reportada um aumento de psoríase entre os pacientes com vitiligo (0,34%) (32).

1.3.4 Formas Clínicas

O vitiligo pode ser classificado de acordo com sua manifestação clínica em duas formas principais, denominadas vitiligo segmentar (VS) e vitiligo não segmentar (VNS) ou comum (21) (Figura 2). O VNS é definido como uma desordem pigmentar crônica caracterizada por manchas brancas na pele, na maioria das vezes simétricas que usualmente aumentam de tamanho com o tempo (34). Quando comparado com o VS, o VNS apresenta manchas normalmente com bordas bem definidas, enquanto que no VS as manchas possuem bordas mais irregulares (35). Diferentemente do VS, no VNS geralmente não é observada falta de pigmentação nos pelos corporais, porém, pode ocorrer uma despigmentação do cabelo com a progressão da doença (21). Tanto o vitiligo segmentar como não-segmentar possuem subclassificações. O VS, menos frequente, pode ser distribuído em unissegmentar, bissegmentar ou plurissegmentar (36). O VNS pode ser subclassificado em:

- Vitiligo acrofacial: os locais afetados são geralmente limitados à face, cabeça, mãos e pés, podendo, eventualmente, evoluir para outros locais do corpo, resultando em vitiligo generalizado típico. Apresenta uma característica distintiva relacionada à despigmentação distal dos dedos e dos orifícios faciais (21, 37);
- Vitiligo de mucosa: tipicamente refere-se ao envolvimento das mucosas orais e genitais (21, 37);
- Vitiligo comum: a forma mais comum do vitiligo é caracterizada por manchas geralmente simétricas; pode afetar qualquer parte do tegumento, incluindo áreas expostas a trauma (21, 37);

- Vitiligo universal: é identificado como a forma mais extensa da doença, geralmente ocorrendo na idade adulta. Essa classificação é normalmente utilizada quando a despigmentação é praticamente universal (80-90% da superfície corporal). Os cabelos podem ser parcialmente poupados (21, 37);
- Vitiligo misto: refere-se à ocorrência concomitante do VS e VNS (21, 37).

Figura 2 - Representação fotográfica das duas principais formas clínicas do vitiligo.



A: Vitiligo não segmentar – lesões bilaterais e frequentemente simétricas. **B:** Vitiligo segmentar – lesões unilaterais. **Fonte:** Faria AR, Tarle RG, Dellatorre G, Mira MT, Castro CC. Vitiligo--Part 2--classification, histopathology and treatment. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2014;89(5):784-90 (37).

1.3.5 Tratamento

Diversas opções de tratamento são disponíveis para o vitiligo, sempre tendo como objetivo a redução dos danos ocasionados aos melanócitos e a repigmentação da pele (37). As recomendações de tratamento definidas pelo Grupo de Trabalho Europeu do Vitiligo (em inglês, *Vitiligo European Task Force - VETF*) são baseadas tanto nas evidências clínicas disponíveis quanto na opinião de um médico especialista, e podem ser divididas em três principais linhas de tratamento (38). Devido a facilidade da aplicação e ao baixo custo, a primeira linha é baseada no tratamento tópico com corticosteroides ou inibidores de caucineurina (37). A segunda linha consiste em tratamentos com fototerapia, utilizando raios de banda estreita de ultra violeta B (*NB-UVB* - 311nm) e raios

ultravioletas A (*UVA*) com psoraleno (*PUVA*). Além disso, esta linha ainda considera o uso sistêmico de corticosteroides, quando o paciente está com despigmentação. Já a terceira linha de tratamento, usada principalmente para pacientes com vitiligo estável, é a intervenção cirúrgica, tendo como alvo o transplante de melanócitos para a região afetada (38).

1.3.6 Etiologia

A etiologia do vitiligo ainda não está totalmente elucidada (20). Existem hipóteses sugerindo causas ligadas a fatores autoimunes, estresse oxidativo, ou de uma falha na via de adesão dos melanócitos (39-41); porém, nenhuma dessas causas age de forma exclusiva, sendo possível que cada uma das hipóteses contribua parcialmente para o aparecimento da doença (20).

Em 2010, Gautier e colaboradores observaram que a pele saudável de pacientes portadores de vitiligo apresentava desprendimento de seus melanócitos após ser submetida à fricção controlada (42). Esse estudo levou à teoria de que a perda de melanócitos se dá devido a uma falha na via de adesão dessas células. Essa teoria foi posteriormente sustentada por outros achados, dentre eles um estudo no qual foi realizado o cultivo de melanócitos perilesionais; em pacientes com vitiligo ativo, essas células estavam em fase de desprendimento levando a apoptose, enquanto que os melanócitos em cultura de controles e de pacientes com vitiligo estável eram morfológicamente normais, sem quaisquer defeitos de adesão (43).

A teoria do estresse oxidativo sugere que pacientes com vitiligo apresentam um estado redox desequilibrado em sua pele (44). Este desequilíbrio pode ocasionar o acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (*ROS*, em inglês, *Reactive Oxygen Species*), formadas através de estímulos exógenos, como radiação ou traumas físicos, ou por ação de compostos fenólicos (45). Pacientes com vitiligo ativo demonstraram um aumento na geração de *ROS* nos eritrócitos e neutrófilos (46). Além disso, também foi verificado um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL6, TNF- α , IL1 β , IFN- γ e IL8, bem como de algumas anti-inflamatórias, como IL5 e IL10, sendo que os níveis de IFN- γ e IL10 se correlacionaram com a geração de *ROS* (46). Com isso, a produção de

peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, também pode levar à destruição dos melanócitos, originando a despigmentação, observada no vitiligo (44, 47).

Atualmente, a teoria mais aceita para a etiologia do vitiligo é uma causa a partir de fatores autoimunes. De fato, evidências sugerem que uma série de eventos autoimunes complexos, envolvendo principalmente a imunidade inata, mediada por células, resultam em danos aos melanócitos (48). As células apresentadoras de antígenos provavelmente migram para os linfonodos para realizar a apresentação de antígenos dos melanócitos para as células-T (24). A apresentação e subsequente ativação dessas células resultam nas respostas adaptativas das células-T (24). As células inatas podem secretar citocinas que irão recrutar e ativar células-T autorreativas, matando diretamente os melanócitos (24).

A ideia de que a célula-T citotóxica CD8⁺ está envolvida e media a destruição progressiva ou perda de melanócitos no vitiligo é suportada por diversos achados. Dentre as evidências que suportam essa teoria estão o aumento perilesional das células-T, a diminuição na proporção de CD4⁺ e CD8⁺, a presença de melanócitos antígeno-específico de células-T CD8⁺ e a citotoxicidade específica do melanócito, devido à presença de células-T CD8⁺ perilesionais (48). Apesar do mecanismo de ativação das células-T citotóxicas, que leva à despigmentação, não estar bem definido, o envolvimento de defeitos funcionais de células-T reguladoras (T_{regs}) tem se mostrado forte candidato para a elucidação desse mecanismo (48). As células-T_{regs} são conhecidas por inibirem a autorreatividade e por manterem as respostas autoimunes em controle (49). Essas células são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição FoxP3 e por altos níveis de CD25 em sua superfície, permitindo a captação de IL2 e outras moléculas envolvidas em funções imunossupressoras (50).

Outra evidência que suporta a hipótese autoimune está relacionado a uma resposta positiva ao tratamento com imunomoduladores tópicos (51). Além disso, uma observação importante que reforça a hipótese autoimune é que a ocorrência do vitiligo está associada a presença de outras doenças autoimunes, tais como anemia perniciosa, doença de Addison, doenças autoimunes da tireoide, LES, psoríase, AR e DM1 (52).

1.3.7 Genética da suscetibilidade ao vitiligo

Um dos principais achados que suportam um controle genético da suscetibilidade ao vitiligo é sua concordância em gêmeos monozigóticos. Um estudo com 22 pares de gêmeos monozigóticos mostrou uma taxa de concordância de 23% (33), superior aos 0% de taxa de concordância encontrada em 24 pares de gêmeos dizigóticos (33). Além disso, um estudo realizado na China com 815 sujeitos portadores de vitiligo e suas famílias identificou uma prevalência de 2,58% e de 0,62% de vitiligo nos parentes de primeiro e segundo grau dos indivíduos estudados, respectivamente (25).

Outras evidências que suportam o envolvimento de um componente genético na suscetibilidade ao vitiligo estão sendo obtidas a partir de análise de segregação complexa. Em 2004, Zhang e colaboradores após analisarem 2.247 chineses portadores de vitiligo e suas famílias, concluíram que variadas formas da doença apresentam diferentes modelos de herança (53). De acordo com os autores, um modelo poligênico aditivo foi aquele que melhor explicou os dados obtidos para pacientes com a maioria das formas clínicas (53). Apenas para o vitiligo universal, o modelo mais adequado foi o modelo ambiental (53).

Diversos estudos baseados em hipóteses vêm confirmando a existência de um componente genético na fisiopatologia do vitiligo. Silva de Castro e colaboradores, em 2010, apresentaram o gene *DDR1* (*discoidin domain receptor tyrosine kinase 1*) como um gene de suscetibilidade ao vitiligo, sugerindo uma base genética para a hipótese da falha de adesão dos melanócitos em pacientes portadores dessa doença (40). Em um estudo subsequente, Tarlé e colaboradores identificaram um polimorfismo no gene *CDH1* (*cadherin 1*), que codifica para a proteína E-caderina, que age como uma âncora transmembrana, sendo um componente central das junções aderentes da camada epitelial (41). Apesar de esses achados fortalecerem a hipótese de perda de adesão, eles também fortalecem a hipótese de uma condição autoimune desregulada no vitiligo, uma vez que a E-caderina também ancora células de Langerhans aos queratinócitos, regulando assim sua diferenciação – portanto, defeitos neste mecanismo podem induzir a doenças inflamatórias e autoimunes (41). Outro estudo recente revelou dois polimorfismos localizados no *locus* do gene *BCHE* (*butyrylcholinesterase*) associados ao

vítiligo. Interessantemente para embasar o racional desta proposta: essa associação estava concentrada entre os pacientes com comorbidade autoimune (39).

Esses estudos, que utilizam genes candidatos, são baseados no pressuposto de que, com base no conhecimento anterior sobre esses genes, é elaborada uma hipótese de seu provável envolvimento com a suscetibilidade a determinada doença. Já os estudos livres de hipóteses, como os GWAS, permitem a identificação de genes cujo envolvimento na doença era previamente desconhecido. Curiosamente, a partir dos resultados obtidos pelos GWAS, foi identificado um compartilhamento genético entre diversas doenças autoimunes, sugerindo um mecanismo genético comum de controle destas doenças. Até o momento já foram publicados oito GWAS para o vítiligo. No quadro 1 estão listados os *loci* identificados por esses estudos.

No primeiro GWAS, foi analisada uma população fundadora isolada de romenos, identificando apenas um *locus* associado com a desordem pigmentar, porém sem nenhuma replicação (54). Ainda no ano de 2010, Jin e colaboradores realizaram um GWAS no qual boa parte dos genes de suscetibilidade identificados codificam para componentes do sistema imune, (como moléculas do *MHC* da classe I e II e os genes *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*), *LPP* (*LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma*), *IL2RA* (*interleukin 2 receptor subunit alpha*), *UBASH3A* (*ubiquitin associated and SH3 domain containing A*), *C1QTNF6* (*C1q and TNF related 6*), *RELER* (*arginine-glutamic acid dipeptide repeats*), *GZMB* (*granzyme B*) e *TYR* (*tyrosinase*)) (55). Esse mesmo grupo publicou um segundo GWAS em 2012 (56), identificando, a partir de uma metanálise entre os GWAS1 (2010) e o GWAS2 (2012), 13 novos *loci* associados ao vítiligo. Seguindo o mesmo racional, o mesmo grupo publicou um terceiro GWAS em 2016 (57). A partir da metanálise dos três GWAS foram então identificados 23 novos *loci* associados à desordem pigmentar. Por fim, no ano de 2018 o *loci PVT1* (*Pvt1 oncogene*) foi identificado como associado ao vítiligo a partir de uma metanálise dos três GWAS anteriores com o estudo de replicação realizado em 1.743 casos e 2.182 controles (58). É importante ressaltar, porém, que as populações utilizadas nos estudos desse grupo não foram totalmente independentes entre si.

Quadro 1 - Loci identificados em GWAS em vitiligo.

Locus	População	Caso/Ctrl	Valor de P	OR (IC)	Ref	Ano
<i>SMOC2</i>	Romenos	32/50	8.51×10 ⁻⁸	7,4 (3,6-15,5)	(54)	2010
<i>HLA-A</i>	Europeus	1514/2813	9.05×10 ⁻²³	1,5 (1,4-1,6)	(55)	2010
<i>HLA-DRB1</i>	Europeus	1514/2813	4.50×10 ⁻³⁴	1,6 (1,5-1,7)	(55)	2010
<i>PTPN22</i>	Europeus	1514/2813	1.31×10 ⁻⁷	1,4 (1,2-1,6)	(55)	2010
<i>LPP</i>	Europeus	1514/2813	1.01×10 ⁻¹¹	1,3 (1,2-1,4)	(55)	2010
<i>IL2RA</i>	Europeus	1514/2813	2.78×10 ⁻⁹	1,3 (1,2-1,4)	(55)	2010
<i>UBASH3A</i>	Europeus	1514/2813	1.26×10 ⁻⁹	1,3 (1,2-1,4)	(55)	2010
<i>C1QTNF6</i>	Europeus	1514/2813	2.21×10 ⁻¹⁶	1,4 (1,3-1,5)	(55)	2010
<i>RERE</i>	Europeus	1514/2813	7.07×10 ⁻¹⁵	1,4 (1,3-1,5)	(55)	2010
<i>GZMB</i>	Europeus	1514/2813	3.44×10 ⁻⁸	1,3 (1,2-1,4)	(55)	2010
<i>TYR</i>	Europeus	1514/2813	1.60×10 ⁻¹⁸	1,5 (1,4-1,7)	(55)	2010
<i>HLA-III</i>	Chineses Han	1149/1468	2.01×10 ⁻¹¹	1,9 (1,6-2,3)	(60)	2010
<i>HLA-C-HLA-B</i>	Chineses Han	1149/1468	2.21×10 ⁻⁸	0,7 (0,6-0,8)	(60)	2010
<i>RNASET2-FGFR1OP-CCR</i>	Chineses Han	4431/5260	2.63×10 ⁻⁹	1,2 (1,1-1,3)	(60)	2010
<i>c6orf10-BTNL2</i>	Europeus	1339/2692	3.22×10 ⁻⁹	1,5*	(61)	2011
<i>HLA-DRB1-DQA1</i>	Europeus	1339/2692	1.56×10 ⁻⁵	1,1*	(61)	2011
<i>OCA2-HERC2</i>	Europeus	450/3182	3.23×10 ⁻⁷	1,2*	(56)	2012
<i>MC1R</i>	Europeus	450/3182	1.08×10 ⁻⁸	0,8*	(56)	2012
<i>IFIH1</i>	Europeus	450/3182	1.67×10 ⁻¹⁰	0,8*	(56)	2012
<i>CD80</i>	Europeus	450/3182	3.97×10 ⁻⁷	1,3*	(56)	2012
<i>CLNK</i>	Europeus	450/3182	9.00×10 ⁻⁸	1,2*	(56)	2012
<i>BACH2</i>	Europeus	450/3182	2.14×10 ⁻⁵	1,2*	(56)	2012
<i>SLA</i>	Europeus	450/3182	1.14×10 ⁻⁶	1,2*	(56)	2012
<i>CASP7</i>	Europeus	450/3182	1.20×10 ⁻⁵	0,8*	(56)	2012
<i>CD44</i>	Europeus	450/3182	3.06×10 ⁻⁸	1,2*	(56)	2012
<i>IKZF4</i>	Europeus	450/3182	1.53×10 ⁻⁹	1,3*	(56)	2012
<i>SH2B3</i>	Europeus	450/3182	1.32×10 ⁻¹¹	0,8*	(56)	2012
<i>TICAM1</i>	Europeus	450/3182	6.98×10 ⁻⁶	1,2*	(56)	2012
<i>TOB2</i>	Europeus	450/3182	1.02×10 ⁻⁷	0,8*	(56)	2012
<i>KIAA1005</i>	Coreanos	260/192	3.31×10 ⁻¹⁵	3,2 (2,4-4,2)	(62)	2013
<i>FASLG</i>	Europeus	4680/39586	6.74×10 ⁻¹⁷	1,3 (1,2-1,4)	(57)	2016
<i>PTPRC</i>	Europeus	4680/39586	1.02×10 ⁻⁹	0,8 (0,8-0,9)	(57)	2016
<i>PPP4R3B</i>	Europeus	4680/39586	3.73×10 ⁻¹⁹	1,5 (1,4-1,7)	(57)	2016
<i>BCL2L1-MIR4435-2HG</i>	Europeus	4680/39586	3.96×10 ⁻⁹	1,2 (1,1-1,2)	(57)	2016
<i>CTLA4</i>	Europeus	4680/39586	1.49×10 ⁻¹⁰	1,2 (1,1-1,2)	(57)	2016
<i>FARP2-STK25</i>	Europeus	4680/39586	3.70×10 ⁻⁹	0,8 (0,7-0,9)	(57)	2016
<i>UBE2E2</i>	Europeus	4680/39586	3.13×10 ⁻⁸	0,9 (0,8-0,9)	(57)	2016
<i>FBXO45-NRROS</i>	Europeus	4680/39586	2.53×10 ⁻⁸	0,9 (0,8-0,9)	(57)	2016
<i>PPP3CA</i>	Europeus	4680/39586	3.43×10 ⁻⁸	0,9 (0,8-0,9)	(57)	2016
<i>IRF4</i>	Europeus	4680/39586	8.86×10 ⁻¹⁶	0,7 (0,7-0,8)	(57)	2016
<i>SERPINB9</i>	Europeus	4680/39586	2.54×10 ⁻⁸	0,8 (0,7-0,9)	(57)	2016
<i>CPVL</i>	Europeus	4680/39586	8.72×10 ⁻²⁶	1,8 (1,6-2,1)	(57)	2016
<i>NEK6</i>	Europeus	4680/39586	1.01×10 ⁻⁸	1,1 (1,1-1,2)	(57)	2016
<i>ARID5B</i>	Europeus	4680/39586	6.93×10 ⁻⁹	1,2 (1,1-1,2)	(57)	2016
<i>PPP1R14B-PLCB3-BAD-GPR137-KCNK4-TEX40-ESRRA-TRMT112-PRDX5</i>	Europeus	4680/39586	4.81×10 ⁻⁸	0,9 (0,8-0,9)	(57)	2016
<i>TNFSF11</i>	Europeus	4680/39586	4.76×10 ⁻⁹	1,2 (1,1-1,2)	(57)	2016
<i>KAT2A-HSPB9-RAB5C</i>	Europeus	4680/39586	6.77×10 ⁻¹⁰	1,2 (1,1-1,3)	(57)	2016
<i>TNFRSF11A</i>	Europeus	4680/39586	2.81×10 ⁻¹⁰	1,2 (1,1-1,3)	(57)	2016

<i>TICAM1</i>	Europeus	4680/39586	1.94×10^{-14}	1,2 (1,1-1,3)	(57)	2016
<i>SCAF1-IRF3-BCL2L12</i>	Europeus	4680/39586	2.36×10^{-9}	0,8 (0,8-0,9)	(57)	2016
<i>RALY-EIF252-ASIP-AHCY-ITCH</i>	Europeus	4680/39586	1.04×10^{-19}	0,6 (0,5-0,7)	(57)	2016
<i>PTPN1</i>	Europeus	4680/39586	9.47×10^{-9}	1,1 (1,1-1,2)	(57)	2016
<i>L1RAPL1</i>	Europeus	4680/39586	7.34×10^{-10}	1,8 (1,5-2,1)	(57)	2016
<i>PVT1</i>	Europeus	1743/2182	5.11×10^{-11}	1,2*	(58)	2018

Caso/Ctrl: Número de casos e controles analisados no estudo. OR (IC): *Odds ratio* (intervalo de confiança) Ref: referência. * Valores de intervalos de confiança não informados.

Em 2010, Quan e colaboradores realizaram um GWAS em uma população chinesa, identificando dois *loci* na região MHC. Nesse mesmo estudo, os autores realizaram uma segunda etapa na pesquisa, na qual foram analisados mais 17 SNPs que haviam apresentado valor de $P < 1 \times 10^{-4}$, sendo que o nível de significância considerado pelos GWAS deve ser inferior a 5×10^{-8} , bem como outras 15 variações fortemente associadas em um GWAS para LES (59). Nessa segunda etapa realizada com 4.431 casos e 5.260 controles, foram identificados dois *loci* com significância estatística, porém apenas um, localizado na região 6q27 atingindo o nível de significância inferior a 5×10^{-8} . A outra variação estava localizada na região 10q22, no gene *ZMIZ1* (*zinc finger MIZ-type containing 1*), apresentando um valor de P igual a 5.01×10^{-3} .

Grande parte dos genes identificados nos GWAS como de suscetibilidade ao vitiligo também se mostraram associados a outras doenças autoimunes. Esses achados, mais uma vez, suportam a ideia da existência de uma base comum regulando o controle de doenças autoimunes; neste caso, o vitiligo poderia ser utilizado como modelo para o estudo do controle da autoimunidade.

2 JUSTIFICATIVA

O vitiligo é um problema para a saúde e bem-estar de milhões de pessoas. Apesar de não ter sua fisiopatologia totalmente elucidada, sabe-se que existe um componente genético e autoimune controlando a suscetibilidade ao vitiligo. Sendo assim, entendemos que esforços no sentido de identificar genes e variantes genéticas envolvidas contribuirão para um maior entendimento da patogênese da doença. Além disso, o vitiligo poderá ser utilizado como um modelo para explorar uma provável base molecular compartilhada na patogênese de doenças autoimunes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste estudo é investigar polimorfismos de genes previamente associados com doenças autoimunes quanto à associação com vitiligo em duas amostras populacionais independentes de desenho distinto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

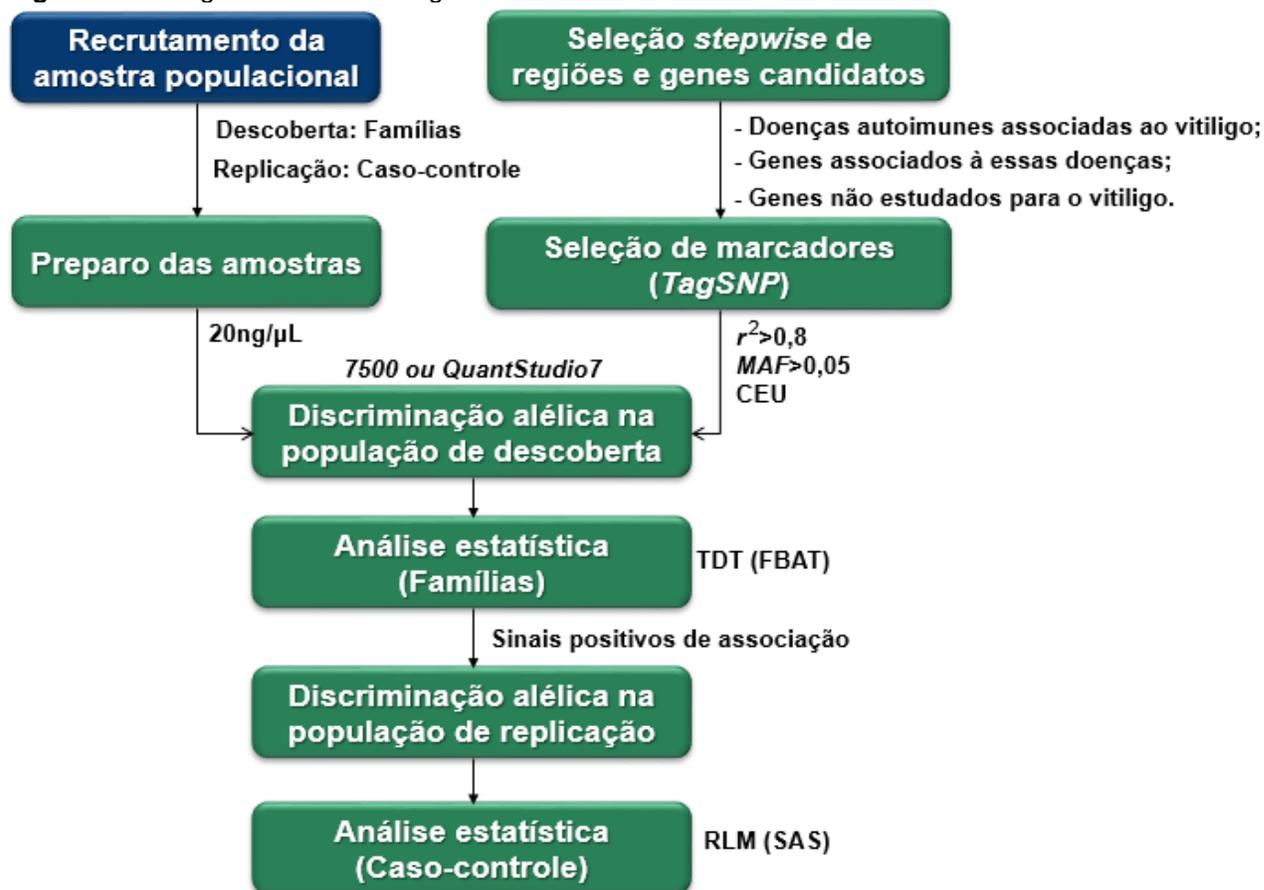
1. Através de uma estratégia *stepwise*, selecionar genes envolvidos em processos autoimunes, candidatos à suscetibilidade ao vitiligo;
2. Utilizar nova estratégia *stepwise* para testar os marcadores selecionados para associação com vitiligo em uma população de descoberta, baseada em famílias e uma população de replicação independente, caso controle;
3. Testar o impacto de covariáveis não genéticas nos sinais de associação detectados;
4. Realizar análise de impacto funcional *in silico* das variantes associadas ao vitiligo.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO GERAL DO ESTUDO

Este trabalho é caracterizado como um estudo de ciência básica que utiliza ferramentas de genética e biologia molecular para a análise do componente genético na suscetibilidade ao vitiligo. Para isso, foi utilizada uma análise primária com um desenho de associação baseada em família e um estudo de replicação com uma população caso-controle. A Figura 3 apresenta o desenho geral do estudo.

Figura 3 - Fluxograma do desenho geral do estudo.



4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo está incluído em um projeto maior, intitulado “Estudo de fatores de risco genéticos de suscetibilidade ao vitiligo” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCPR (Pontifícia Universidade Católica do Paraná – nº 1975 – e na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – Parecer nº14394 (Anexo I). Todos os indivíduos anteriormente recrutados, ou seus representantes legais, foram solicitados a ler e, caso concordassem participar do estudo, assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II).

4.3 AMOSTRAS POPULACIONAIS

As amostras populacionais utilizadas neste estudo foram recrutadas no período de 2004 a 2007 junto ao serviço de dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba e a um consultório particular, com o objetivo de serem utilizadas em estudos epidemiológicos e análise de associação genética com suscetibilidade ao vitiligo. O recrutamento dos indivíduos afetados, seus pais e controles independentes foi realizado no sul do Brasil, nos estados do Paraná e Santa Catarina. Os indivíduos recrutados foram avaliados por um único médico dermatologista, com reconhecida experiência no tratamento de vitiligo. Com a finalidade de determinar a presença da doença, todos os indivíduos foram submetidos a exames clínicos de pele e a exames de lâmpada de Wood. Este exame permite detecção do vitiligo através da emissão de luz ultravioleta “A” em ambiente escuro, permitindo a diferenciação da acromia (ausência de pigmento), característica do vitiligo, e da hipocromia (pequena quantidade de pigmento), encontrada em outras doenças. A confirmação do diagnóstico de vitiligo, quando necessária, foi realizada através de biopsia e exame histopatológico. Depois de diagnosticados, os sujeitos da pesquisa responderam à questionários para a obtenção dos dados demográficos e clínicos como: sexo, idade de início da doença (autorrelato da data da primeira mancha branca observada), presença de histórico familiar de vitiligo e ocorrência de doenças autoimunes entre pais e irmãos do indivíduo afetado.

4.3.1 População de famílias

A amostra populacional do estudo baseado em famílias é composta por 596 indivíduos distribuídos em 188 famílias nucleares formadas por indivíduos afetados com vitiligo, independente de sua forma clínica, seus pais e familiares, quando disponível. Ao todo, 211 trios puderam ser derivados desta amostra populacional.

4.3.2 População Caso-controle

Para o estudo de replicação, foi utilizada uma amostra populacional independente, caso-controle formada por 131 casos de vitiligo e 119 controles pareados por idade e sexo. Os critérios de diagnóstico e de recrutamento dos pacientes com vitiligo foram iguais aos descritos anteriormente (item 4.3). Para o recrutamento dos sujeitos do grupo controle foram realizados exames físicos completos por médico dermatologista experiente, sendo incluídos somente indivíduos com ausência de sinais de vitiligo ou de qualquer outra doença autoimune ou inflamatória crônica. Além disso, somente foram recrutados indivíduos com autorrelato negativo de histórico pessoal ou familiar de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas.

As principais características demográficas e clínicas dos 211 pacientes afetados com vitiligo na amostra populacional baseada em família, bem como dos 131 indivíduos que compõem o grupo de casos do estudo caso-controle, são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos filhos afetados da população baseada em família e casos de pacientes com vitiligo da população caso-controle.

Características	Baseado em família n=211	Caso-controle n=131	P
Gênero			
Masculino	90 (42,7%)	53 (40,4%)	0,80*
Feminino	121 (57,3%)	78 (59,5%)	
Idade de início do vitiligo	18,7±12,01	26,40±17,01	<0,001**
Doenças Autoimunes			
Presença	105 (49,76%)	52 (39,7%)	0,28*
Ausência	105 (49,76%)	68 (51,9%)	
Dados não disponíveis	1 (0,47%)	11 (8,4%)	
Forma clínica			
Segmentar	37 (17,5%)	13 (9,9%)	0,76***
Não-Segmentar	174 (82,5%)	118 (90,1%)	
-Localizado	18 (8,5%)	7 (5,3%)	
-Comum	105 (49,8%)	81 (61,8%)	
-Acrofacial	48 (22,7%)	26 (19,8%)	
-Universal	3 (1,4%)	4 (3,1%)	

Valores exibidos em n(%) para gênero, doenças autoimunes e forma clínica e média ± desvio padrão para a idade de início do vitiligo. * Teste exato de Fisher. ** Teste *t de student*. *** Teste do *qui quadrado*.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

O material genético utilizado nos experimentos foi obtido a partir de sangue total. Foi realizada a coleta de 5 mL de sangue através de punção venosa em tubos do tipo vacuotainer contendo EDTA (Ácido Etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante, em condições ideais de assepsia. O sangue coletado foi centrifugado para que fosse possível a obtenção da camada leucocitária (*buffy coat*), que foi separada para a extração do DNA, segundo o protocolo para extração rápida do DNA genômico proposto por John S. W. e colaboradores (63). As amostras de DNA extraídas foram estocadas a -20°C em sala com controle e monitoramento de temperatura. O protocolo detalhado da técnica de extração de DNA está descrito no Anexo III.

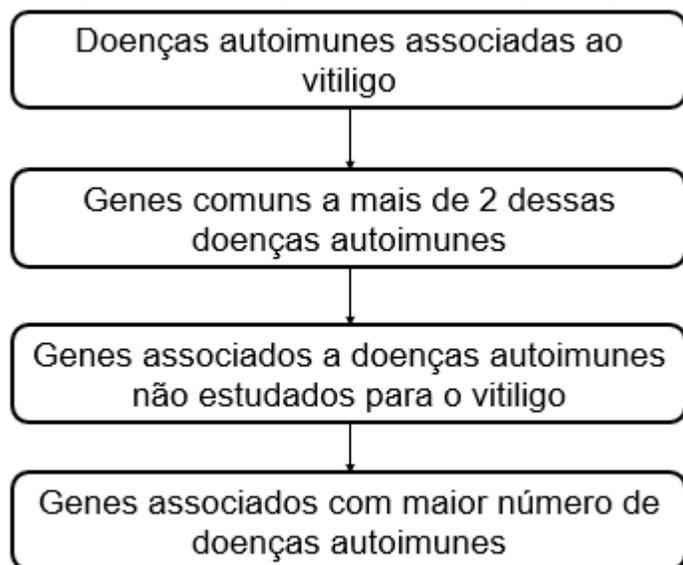
Com o objetivo de analisar a concentração de DNA obtido pela extração, o material genético foi submetido à leitura por espectrofotometria em equipamento *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*). Este método faz uso do princípio de absorção seletiva da luz ultravioleta por moléculas de DNA em 260nm, enquanto proteínas fazem essa absorção em 280nm. Sendo assim, é possível realizar a quantificação do DNA e das proteínas que

constituem a amostra extraída através da leitura nestes dois comprimentos de onda. Para realizar o cálculo da concentração de DNA é utilizado o valor da absorbância encontrada em 260nm, enquanto que a razão A260/280 indica o grau de pureza da amostra. Após a determinação da concentração, as soluções concentradas foram diluídas a 20ng/μL (solução de trabalho) e armazenadas a -20°C.

4.5 SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS

Os genes candidatos foram selecionados seguindo a seguinte estratégia *stepwise*: primeiramente, através de uma revisão da literatura, foram identificadas as doenças autoimunes mais comumente associadas ao vitiligo. Buscou-se, na sequência, por genes que haviam sido associados a um mínimo de duas dessas doenças autoimunes, não incluindo o vitiligo; como resultado, produziu-se uma lista de genes envolvidos com autoimunidade que ainda não haviam sido testados para associação com vitiligo. Por fim foram selecionados os genes que foram associados a um maior número de doenças autoimunes (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma da estratégia *stepwise* de seleção de genes candidatos.



4.6 SELEÇÃO DOS MARCADORES

Taq SNPs foram selecionados de forma a se atingir 100% da cobertura física dos genes candidatos selecionados. Todos os marcadores foram selecionados utilizando-se como critério uma frequência alélica mínima (MAF – *minor allele frequency*) de 5% ou mais para os *loci* em estudo na população Caucasiana. O parâmetro de corte para definir DL entre dois marcadores foi um valor de r^2 maior do que 0,8.

4.7 GENOTIPAGEM

Os *SNPs* foram genotipados nas plataformas *ABI 7500 polarized fluorescence TaqMan assay* ou *Thermo-Life QuantStudio 7 Flex*. O princípio da metodologia *TaqMan* consiste em utilizar sondas marcadas com uma molécula fluorescente (*SNP genotyping assay* - fluoróforo, VIC™ ou FAM™, cada qual monitorando um alelo específico para o *SNP*) e outra (*Quencher*) que absorve a fluorescência emitida pelo fluoróforo quando a sonda está íntegra. Além disso, também são usados pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e outros componentes (constituintes do *Master Mix*) necessários para a *Taq DNA* polimerase realizar a extensão da fita de DNA. A sonda é constituída de uma sequência alvo (que monitora o polimorfismo de interesse) a qual hibridiza entre os dois iniciadores. As moléculas de fluoróforo e do *Quencher* ficam nas extremidades da sonda íntegra. A atividade de exonuclease da *Taq DNA* polimerase leva à clivagem da sonda. Com isso, durante a extensão da nova fita, o fluoróforo liberado emitirá sinal que não será captado pelo *Quencher*, mas sim pelo equipamento, podendo ser por ele classificado os resultados de genotipagem.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 ou 384 poços. Para cada placa foi preparado um Super Master Mix (SMM - composto por água ultra pura, *Master Mix* e *SNP genotyping assay*, na concentração final de 1X) nos volumes descritos na Tabela 2, segundo proposto por Frigeri, 2015 (64). Sendo assim, em cada poço da placa, foram aplicados 5µL desse SMM e 3µL de solução de DNA das amostra (na concentração de 20ng). Para monitoramento de contaminação, foram realizados, para cada placa, dois controles negativos, os quais continham água no lugar das amostras de DNA.

Tabela 2 - Protocolo padronizado para os ensaios de genotipagem.

Reagentes	Volume (μL)
Água MiliQ	1,9
Master Mix	3,0
SNP Genotyping Assay (sonda TaqMan®)	0,1
DNA (20ng/ μL)	3,0
Total	8,0

A quantidade de reagente está apresentada para cada uma das amostras.

As condições de amplificação em ambas as plataformas utilizadas estão descritas na Tabela 3. O ensaio de discriminação alélica envolve três etapas principais:

- 1- Pré-leitura: Etapa na qual são detectados os *backgrounds* de fluorescência de cada sonda antes da reação de amplificação.
- 2- Reação de amplificação: Também denominada de *cycle stage*. Consiste na submissão das amostras em 50 ciclos de desnaturação, hibridação dos oligonucleotídeos e extensão dos fragmentos.
- 3- Pós-leitura: Realizada com o objetivo de subtrair os valores de *background* de fluorescência obtidos na etapa de pré-leitura dos valores obtidos no final da reação.

Tabela 3 - Condições de amplificação nas plataformas *ABI 7500 polarized fluorescence TaqMan assay* ou *Thermo-Life QuantStudio 7 Flex*.

Condições	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (s)
Pré-leitura	60	60
Estágio de espera (<i>holding stage</i>)	95	600
Desnaturação	95	15
Hibridização e extensão	60	120
Pós- leitura	60	60

As etapas de desnaturação e hibridização dos oligonucleotídeos e extensão dos fragmentos, que compõem o *cycle stage*, foram realizadas em 50 ciclos (região destacada).

A interpretação dos resultados ocorre através da detecção da fluorescência no comprimento de onda de um dos fluoróforos (VICTM e/ou FAMTM). Indivíduos homocigotos terão apenas uma das sondas hibridizando em seu material genético, sendo detectadas

apenas fluorescências de uma das sondas. Já em indivíduos heterozigotos, ambas as sondas hibridizarão, sendo, portanto detectadas fluorescências em ambos os comprimentos de onda.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis clínicas e demográficas dos portadores de vitiligo da amostra populacional baseada em família e da amostra caso-controle foram comparados usando os testes de *qui-quadrado*, teste exato de *fisher* e *t de student*.

Análise de desequilíbrio de ligação, visando verificar a independência dos sinais detectados e a verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizadas conforme implementado no programa *Haploview*, versão 4.2. Análise de associação baseada em famílias foi realizada através do Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) conforme implementado no programa FBAT (*Family-Based Association Test*), versão 2.0.2 (65). Além disso, os alelos das variações foram novamente analisados através de análise de regressão logística, permitindo a análise conjunta de fatores ambientais e genéticos que possam estar influenciando na associação. Essa análise também permite estimar a “*odds ratio*” (*OR*, razão de chance) e os intervalos de confiança, utilizando para isso o *software SAS* (v.9.1). Todas as análises estatísticas foram realizadas para os modelos genéticos aditivo, dominante e recessivo, sendo apresentado como resultados o modelo melhor ajustado. Para genes que apresentaram *SNPs* com sinais de associação estatisticamente significativos com vitiligo *per se* (independente das formas clínicas) foram realizadas análises haplotípicas através do FBAT utilizando-se do comando “*hbat*”. Nesses casos, foram analisados apenas os haplótipos que apresentarem uma frequência do haplótipo superior a 10%.

Além dos testes de associação dos marcadores genéticos com o vitiligo *per se*, foram realizadas análises estratificadas pelas seguintes covariáveis: presença de comorbidade autoimune (Tireoidite de Hashimoto, DM1, halo-nevi, psoríase, alopecia areata, escleroderma, AR, LES), forma clínica (segmentar ou não segmentar) e idade de início da doença, usando como corte a idade de 25 anos (média de idade de diagnóstico

reportada na literatura (33)). A estatística aplicada para essas análises foi a mesma utilizada nos testes de associação com o vitiligo *per se*.

Análise de associação na amostra caso-controle foram realizadas através de técnicas de regressão logística, utilizando o programa IBM SPSS versão 21.

Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de *P* se mostraram inferiores 0,05.

4.9 PREVISÃO DE IMPACTO FUNCIONAL

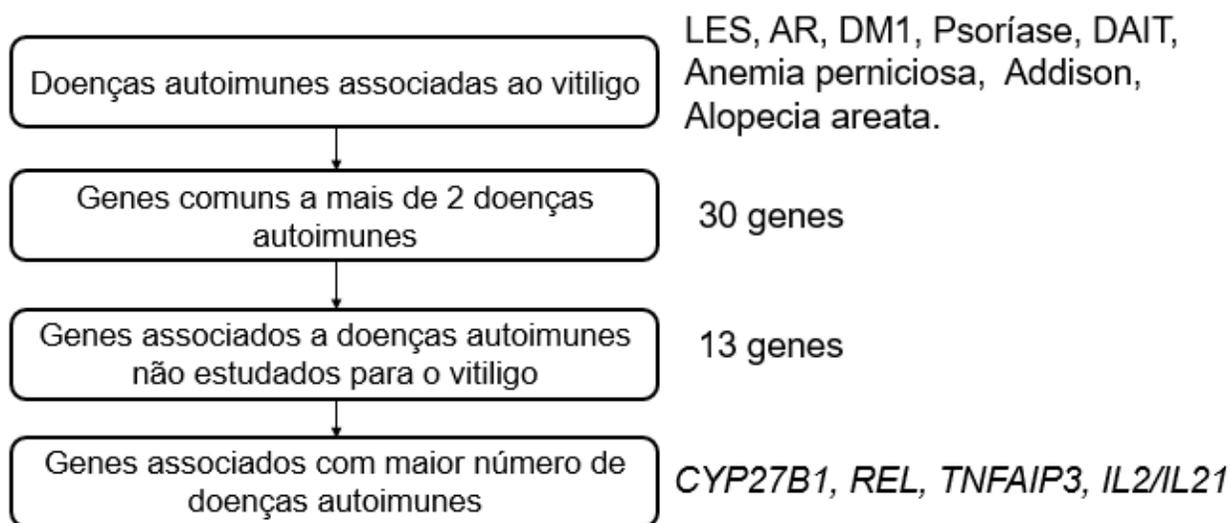
Para prever o impacto funcional de variantes associadas ao vitiligo que se encontravam em regiões intrônicas, foi utilizada a ferramenta de previsão *in silico* *HaploReg v4.1* (66). Além disso, para verificar o impacto funcional de variantes em DL com os marcadores associados no presente estudo, buscou-se por resultados disponíveis na base de dados do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

5 RESULTADOS

5.1 GENES CANDIDATOS SELECIONADOS

A Figura 5 mostra os resultados obtidos para nossa estratégia *stepwise* de a seleção dos genes candidatos. As doenças autoimunes mais frequentemente associadas ao vitiligo foram o LES, AR, DM1, Psoríase, doenças autoimunes da tireoide, anemia perniciosa, doença de Addison e alopecia aerata. Foram encontrados um total de 30 genes associados a um mínimo de duas dessas doenças autoimunes, dos quais 13 ainda não haviam sido estudados para o vitiligo (Tabela 4). Foram por fim selecionados para investigação os genes *CYP27B1* (*Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1*), *REL* (*REL proto-oncogene, NF- κ B subunit*), *TNFAIP3* (*TNF alpha induced protein 3*), *IL2* (*Interleukin 2*) e *IL21* (*Interleukin 21*).

Figura 5. Fluxograma da estratégia *stepwise* de seleção de genes candidatos e resultados obtidos.



LES: Lupus Eritematoso Sistêmico; AR: Artrite Reumatoide; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DAIT: Doenças Autoimunes da Tireoide.

Tabela 4- Relação dos genes associados as doenças autoimunes frequentemente relacionadas ao vitiligo.

	DM1	AR	LES	Pso	DG	TH	DA	AA	AP	Vit
BACH2	(67-69)	(70)			(71)					(56)
BLK		(72, 73)	(72, 74-84)							
C1QTNF6	(67, 85)				(86, 87)					(55)
CLEC16A	(88, 89)	(88, 89)	(90)			(91)	(89)	(92)		
CTLA4	(93-100)	(101-110)	(80, 111-117)		(118-126)	(124, 126, 127)	(128, 129)	(92, 130, 131)		(132-136)
CYP27B1	(137-141)				(141-143)	(141, 143)	(141, 144, 145)			
FASL	(146)	(147)	(148-150)							(151)
FOXP3		(152)	(153, 154)	(155, 156)	(157, 158)			(159)		(48, 133, 160)
IFIH1	(161-164)		(90, 165, 166)	(167-169)						(56)
IL10	(170)		(90)							(171, 172)
IL12B		(173-175)	(90, 176-178)	(168, 179-191)						
IL2	(192)	(193)	(194, 195)	(196)			(197)			
IL21			(194, 198-200)	(173)	(201)	(201)	(202)	(92)		
IL23A	(203)			(181, 186, 204)	(205)					
IL2RA	(206-209)	(210-213)	(214)					(215)		(55)

Valores dentro dos parenteses representam as referências. DM1 – *Diabetes mellitus* tipo 1; AR – Artrite reumatoide; LES – Lupus eritematoso sistêmico; Pso – psoríase; DG – Doença de Graves; TH – tireoidismo de Hashimoto; DA – Doença de Addison; AA – Alopecia areata; AP – Anemia perniciosa; Vit – Vitiligo.

	DM1	AR	LES	Pso	DG	TH	DA	AA	AP	Vit
IL6	(216)	(217-220)	(221)		(222, 223)	(224, 225)				(172)
IKZF1	(69, 226)		(78, 166, 227)							
IRF5		(212, 228-231)	(90, 232-235)							
LPP		(236)	(237)							(55)
NALP1	(238)						(238)		(239)	(239-242)
PRDM1		(102, 243)	(90)							
PTPN22	(244-258)	(259-276)	(111, 249, 277-284)	(285)	(122, 286-290)		(291, 292)	(293-295)		(55, 296-300)
REL		(301, 302)	(303)	(169, 185, 304)			(202)			
STAT4	(305-307)	(260, 308-316)	(80-83, 308, 311, 317-324)	(325)	(326, 327)	(326, 327)				(133)
TLR2	(328) (329)			(330)						(331)
TNF-A	(216, 332-335)	(336) (337)			(222, 223, 225, 338-340)	(225, 340)		(215, 341)		(342-345)
TNFAIP3	(346)	(347-351)	(83, 348, 350, 352-357)	(358-361)	(362)					
TNIP1			(90, 363-365)	(181, 185, 188, 191, 359, 360)						
UBASH3A	(366)		(367, 368)		(369)					(55)
VDR	(146, 370-373)	(374-376)	(377-380)		(381-386)	(383, 387-389)	(390)			(391, 392)

Valores dentro dos parenteses representam as referências. DM1 – *Diabetes mellitus* tipo 1; AR – Artrite reumatoide; LES – Lupus eritematoso sistêmico; Pso – psoríase; DG – Doença de Graves; TH – tireoidismo de Hashimoto; DA – Doença de Addison; AA – Alopecia areata; AP – Anemia perniciosa; Vit – Vitiligo.

5.2 MARCADORES SELECIONADOS

Apenas para o gene da *IL21*, devido ao grande número de *TagSNPs*, não foi possível incluir todos os marcadores necessários para a cobertura física completa do *locus*, sendo selecionados apenas os *Tag SNPs* previamente associados a outras doenças autoimunes.

Para os genes *CYP27B1* e *REL* os marcadores foram selecionados a partir de informações disponíveis na base de dados pública do *International HapMap Project*. Devido à descontinuação desse projeto em Junho de 2016, dados dos genes *TNFAIP3*, *IL2* e *IL21* foram obtidos a partir do projeto 1000 Genomas através do programa *Ferret* (v.2.1.1) (393). Esses dados foram então exportados para o *Haploview* (v.4.2) para a seleção dos *Tag SNPs*.

A Tabela 5 descreve os genes candidatos, bem como os marcadores selecionados para cada um deles.

Tabela 5 - Identificação dos marcadores selecionados para o estudo.

Gene (OMIM)	Marcador	Código TAQMAN®	SNP [A1/A2]
<i>CYP27B1</i> (609506)	rs4646536	C_25623453_10	[A/G]
<i>REL</i> (164910)	rs842647	C_8851273_10	[A/G]
<i>REL</i> (164910)	rs13031237	C_3219755_10	[G/T]
<i>REL</i> (164910)	rs6545836	C_2080999_10	[A/G]
<i>REL</i> (164910)	rs842648	C_8851274_10	[A/G]
<i>TNFAIP3</i> (191163)	rs5029933	C_44699248_10	[A/G]
<i>TNFAIP3</i> (191163)	rs5029930	C_44699244_10	[A/C]
<i>TNFAIP3</i> (191163)	rs610604	C_884105_20	[G/T]
<i>TNFAIP3</i> (191163)	rs582757	C_8300291_10	[C/T]
<i>IL2</i> (147680)	rs2069763	C_15859920_10	[C/A]
<i>IL2</i> (147680)	rs2069779	C_15859942_10	[A/G]
<i>IL2</i> (147680)	rs2069778	C_15859943_10	[A/G]
<i>IL21</i> (605384)	rs2055979	C_1597496_10	[A/C]
<i>IL21</i> (605384)	rs907715	C_8949748_10	[C/T]
<i>IL21</i> (605384)	rs4833837	C_25473096_10	[A/G]

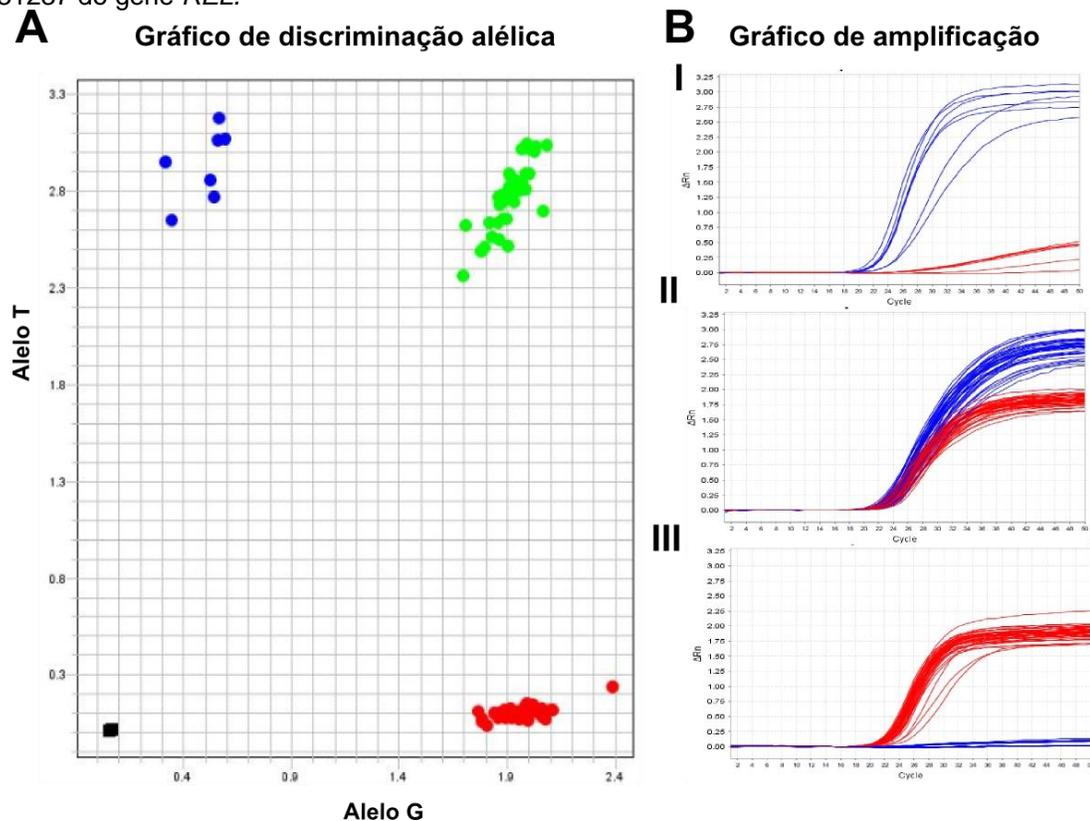
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man® (<http://omim.org/>). rs, dbps: *reference SNP database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Código TaqMan®, específico para cada polimorfismo (Applied Biosystems). SNP [A1/A2]: [Alelo1/Alelo2] monitorados, respectivamente, pelos fluoróforos VIC/FAM.

5.3 ANÁLISE GERAL DA GENOTIPAGEM POR TaqMan®

A Figura 6 apresenta um exemplo dos gráficos de discriminação alélica com as respectivas curvas de amplificação obtidas para o marcador rs13031237 do gene *REL*.

Amostras discriminadas como esferas em azul na figura 6.A (alelo 4/4, FAM/FAM), apresentam genótipo TT correspondente à curva de amplificação observado na figura 6.B-I. Amostras discriminadas como esferas em verde na figura 6.A (alelo 3/4, VIC/FAM), apresentam genótipo GT correspondente à curva de amplificação observado na figura 6.B-II. Amostras discriminadas como esferas em vermelho na figura 6.A (alelo 3/3, VIC/VIC), apresentam genótipo GG correspondente à curva de amplificação observado na figura 6.B-III. Todos os marcadores e amostras genotipadas apresentaram perfil de discriminação e amplificação semelhante ao observado na Figura 6.

Figura 6 - Exemplo de perfil de discriminação alélica e de gráfico de amplificação para o marcador rs13031237 do gene *REL*.



Perfil de discriminação alélica (A) e curvas de amplificação (B) obtidos para o marcador rs13031234. B.I- Curva de amplificação das amostras discriminadas em azul na parte A (genótipo TT). B.II- Curva de amplificação das amostras discriminadas em verde na parte A (genótipo TG). Curva de amplificação das amostras discriminadas em vermelho na parte A (genótipo GG). Os quadrados pretos na região inferior esquerda da figura A representam os controles negativos, confirmando a amplificação específica.

5.4 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO BASEADA EM FAMÍLIA

5.4.1 CYP27B1

A frequência alélica do *tag SNP* rs4646536 do gene *CYP27B1* permaneceu dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P=0,999$) com uma porcentagem de genotipagem de 96,4%. Não se detectou associação entre os alelos do *SNP* rs4646536 e a ocorrência de vitiligo *per se* na amostra populacional avaliada (trios familiares) em nenhum dos modelos analisados (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de associação do polimorfismo rs4646536 do gene *CYP27B1* com o vitiligo *per se*.

SNP	FA	FI	Z	P (FBAT)	P (SAS)	OR (95%IC)
rs4646536 ^a	-	96	-	0,93	0,83	0,96 (0,66-1,39)
rs4646536/A ^d	0,72	40	-0,33	0,74	0,75	1,13 (0,54-2,38)
rs4646536/G ^d	0,28	86	-0,10	0,91	0,72	0,98 (0,60-1,57)

FA: Frequência alélica; FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT. OR (95%IC): *Odds ratio* (95% intervalo de confiança). ^a Modelo aditivo. ^d Modelo dominante.

Não foram verificados sinais de associação com significância estatística nas análises estratificadas por presença de comorbidade autoimune, forma clínica e idade de início da doença (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação dos marcadores do gene *CYP27B1* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

	FI	Z	P (FBAT)	P (SAS)	OR (95%IC)
rs4646536/G					
Doença Autoimune					
Presença	44	0,1	0,88 ^d	0,73 ^d	0,88 (0,45-1,75)
Ausência	23	1,4	0,16 ^r	0,18 ^r	0,52 (0,21-1,32)
Forma Clínica					
Segmentar	16	-0,3	0,79 ^d	0,59 ^d	0,75 (0,26-2,14)
Não segmentar	71	0,0	1,00 ^d	0,79 ^d	0,94 (0,56-1,55)
Idade					
<25 anos	57	-0,2	0,79 ^d	0,84 ^d	0,94 (0,51-1,72)
≥25 anos	33	0,2	0,85 ^d	0,92 ^d	1,04 (0,46-2,38)

FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT. P (SAS): valor de P obtido na regressão logística realizada no SAS. OR (95%IC): *Odds ratio* (95% intervalo de confiança). ^dModelo dominante. ^rModelo recessivo.

5.4.2 REL

Foram testados para associação com vitiligo quatro *tag SNPs* (rs6545836, rs842648, rs13031237 e rs842647) para se atingir a cobertura física completa do gene *REL*. As frequências alélicas de todos os polimorfismos testados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e apresentaram uma porcentagem de genotipagem igual ou superior a 95% (Tabela 8).

Tabela 8 - Porcentagem de genotipagem obtida e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos *SNPs* rs6545836, rs842648, rs13031237 e rs842647 do gene *REL*.

	rs6545836	rs842648	rs13031237	rs842647
% Gen.	97,3	99,5	94,9	97,8
HWE	0,88	1,00	0,71	0,59

% Gen.: Porcentagem de genotipagem obtida para cada marcador; HWE: Valor de *P* obtido para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

No presente estudo não foi encontrada evidência de associação estatisticamente significativa entre os alelos dos marcadores rs13031237, rs842647 e rs842648 do gene *REL* com o vitiligo na população baseada em famílias em ambos os modelos analisados. Já o alelo A do marcador rs6545836 mostrou associação com significância estatística com proteção à doença pigmentar (Tabela 9).

O alelo A da variação rs6545836 foi associado com a proteção ao vitiligo em pacientes com comorbidade autoimune, forma clínica não segmentar e com idade de início inferior a 25 anos (Tabela 10). Resultados opostos foram detectados para o *SNP* rs842647. O alelo G desse polimorfismo foi associado com a suscetibilidade ao vitiligo em pacientes sem comorbidade autoimune e forma clínica segmentar, porém somente na análise realizada no FBAT. Apesar do alelo A do *SNP* rs842648 se mostrar associado em pacientes com vitiligo segmentar, o número de famílias informativas para esse grupo foi bastante reduzido, diminuindo o poder estatístico da análise.

Tabela 9 - Análise de associação dos polimorfismos rs6545836, rs842648, rs13031237 e rs842647 do gene REL com o vitiligo per se.

SNP	FA	FI	Z	P (FBAT)	P (SAS)	OR (95%IC)
rs6545836 ^a	-	85	-	0,01	0,01	1,69 (1,11-2,56)
rs6545836/A ^d	0,19	80	-2,6	0,01	0,01	0,55 (0,34-0,90)
rs6545836/G ^d	0,81	23	1,0	0,30	0,16	2,23 (0,74-6,78)
rs842648 ^a	-	52	-	0,44	0,58	1,17 (0,67-2,06)
rs842648/A ^r	0,90	51	0,7	0,49	0,62	0,86 (0,47-1,55)
rs842648/G ^r	-	-	-	-	0,78	1,39 (0,13-14,16)
rs842647 ^a	-	120	-	0,21	0,19	0,80 (0,57-1,12)
rs842647/A ^d	0,63	52	-0,1	0,83	0,81	1,08 (0,57-2,06)
rs842647/G ^d	0,36	101	1,4	0,15	0,11	1,45 (0,92-2,29)
rs13031237 ^a	-	114	-	0,43	0,18	0,78 (0,55-1,12)
rs13031237/G ^d	0,67	46	0,9	0,39	0,81	0,92 (0,46-1,83)
rs13031237/T ^d	0,33	101	1,5	0,12	0,06	1,57 (0,97-2,49)

FA: Frequência alélica; FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT. OR (95%IC): Odds ratio (95% intervalo de confiança). ^aModelo aditivo. ^dModelo dominante. ^rModelo recessivo. Em negrito, valores de P < 0,05.

Tabela 10 - Associação dos marcadores do gene REL estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

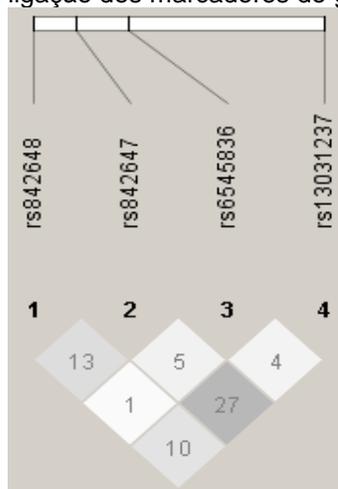
	FI	Z	P (FBAT)	P (SAS)	OR (95%IC)
rs6545836/A					
Doença Autoimune					
Presença	40	-2,9	0,003^a	0,005^a	0,38 (0,19-0,75)
Ausência	44	-0,8	0,42 ^a	0,47 ^a	0,81 (0,45-1,43)
Forma Clínica					
Segmentar	11	-1,1	0,28 ^a	0,41 ^a	0,62 (0,22-1,92)
Não segmentar	75	-2,4	0,01^a	0,02^a	0,58 (0,37-0,90)
Idade					
<25 anos	52	-2,4	0,01^a	0,03^a	0,53 (0,31-0,92)
≥25 anos	36	-1,2	0,22 ^a	0,31 ^a	0,70 (0,35-1,39)
rs842648/A					
Doença Autoimune					
Presença	26	-0,9	0,39 ^r	0,77 ^r	1,13 (0,48-2,65)
Ausência	24	2,0	0,04^r	0,23 ^r	0,58 (0,24-1,41)
Forma Clínica					
Segmentar	11	2,3	0,02^r	0,04^r	0,19 (0,04-0,92)
Não segmentar	40	-0,4	0,70 ^r	0,46 ^r	1,28 (0,67-2,44)
Idade					
<25 anos	35	0,7	0,51 ^r	0,60 ^r	0,83 (0,40-1,70)
≥25 anos	17	0,2	0,81 ^r	0,89 ^r	1,08 (0,38-3,25)

rs842647/G					
Doença Autoimune					
Presença	47	0,2	0,83 ^d	0,24 ^d	1,51 (0,76-3,01)
Ausência	53	1,9	0,05^d	0,20 ^d	1,51 (0,81-2,82)
Forma Clínica					
Segmentar	17	2,1	0,04^d	0,06 ^d	4,22 (0,94-19,02)
Não segmentar	85	0,7	0,48 ^d	0,68 ^d	1,10 (0,69-1,76)
Idade					
<25 anos	70	1,1	0,25 ^d	0,13 ^d	1,55 (0,88-2,75)
≥25 anos	35	0,9	0,39 ^d	0,68 ^d	1,19 (0,52-2,69)
rs13031237/T					
Doença Autoimune					
Presença	48	0,9	0,35 ^d	0,36 ^d	1,38 (0,69-2,77)
Ausência	53	1,2	0,21 ^d	0,10 ^d	1,72 (0,91-3,26)
Forma Clínica					
Segmentar	19	0,5	0,63 ^d	0,71 ^d	1,20 (0,45-3,17)
Não segmentar	83	1,5	0,14 ^d	0,14 ^d	1,44 (0,89-2,34)
Idade					
<25 anos	69	0,9	0,33 ^d	0,08 ^d	1,69 (0,94-3,03)
≥25 anos	36	1,3	0,20 ^d	0,42 ^d	1,41 (0,62-3,22)

FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de *P* obtido no teste de TDT realizado no FBAT. *P* (SAS): valor de *P* obtido na regressão logística OR (95%IC): Odds ratio (95% intervalo de confiança). ^aModelo aditivo. ^dModelo dominante. ^rModelo recessivo. Em negrito, estão destacados valores de *P*<0,05.

A Figura 7 mostra a independência entre os *Tag SNPs* testados, sugerindo evidências independentes de associação (valores de r^2 inferiores a 80).

Figura 7 - Análise do desequilíbrio de ligação dos marcadores do gene *REL*.



Valores dentro dos losangos representam a medida do desequilíbrio de ligação quanto ao parâmetro r^2 . A intensidade de cores é proporcional à variação do valor de r^2 . Fonte: obtido do programa Haploview.

A análise haplotípica dos marcadores do gene *REL* com o vitiligo identificou uma evidência de associação entre os alelos do haplótipo número 3 e a proteção ao vitiligo (Tabela 11). Esse haplótipo contém o alelo “A” da variante rs6545836, anteriormente identificada associada à proteção ao vitiligo.

Tabela 11 - Haplótipo das variantes do gene *IL2*

Haplótipo					FH	FI	Z	P
Nº	rs842647	rs13031237	rs6545836	rs842648				
1	G	G	G	A	0,36	94	1,6	0,12
2	A	T	G	A	0,33	90	1,2	0,24
3	A	G	A	A	0,19	71	-2,5	0,01

FH: Frequência do Haplótipo; FI: Número de famílias informativas; Z: Teste Z; P: valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT; Nº: Número do haplótipo. Em negrito, estão destacados valores de P (FBAT) com significância estatística.

Análise de previsão de impacto funcional da variante rs6545836, localizada em uma região não codificante, revelou possível alteração de quatro motivos de DNA (*Hoxb6*, *Pou2f2*, *Pou5f1* e *Sox*), que são padrões curtos e recorrentes na sequência de DNA que podem apresentar uma função biológica. Além disso, o *HaploReg v4.1* identificou uma correlação entre o rs6545836 com a expressão do gene *AHSA2* (*activator of HSP90 ATPase homolog 2*) em monócitos do sangue periférico.

5.4.3 *TNFAIP3*

Foi selecionado um total de quatro *Tag SNPs* necessários para a cobertura física completa do gene *TNFAIP3*. As frequências alélicas das variantes analisadas estavam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg e apresentaram uma porcentagem de genotipagem igual ou superior a 89% (Tabela 12).

Não foram identificados sinais de associação estatisticamente significativos entre as variantes analisadas e o vitiligo *per se* (Tabela 13).

Tabela 12 - Porcentagem de genotipagem obtida e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos SNPs rs5029930, rs610604 e rs582757 do gene *TNFAIP3*.

	rs5029930	rs5029933	rs610604	rs582757
% Gen.	99,4	97,8	97,6	89,4
HWE	0,30	0,19	0,28	0,33

% Gen.: Porcentagem de genotipagem obtida para cada marcador; HWE: Valor de *P* obtido para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 13 - Análise de associação dos polimorfismos rs5029930, rs610604 e rs582757 do gene *TNFAIP3* com o vitiligo per se.

SNP	FA	FI	Z	P (FBAT)	P (SAS)	OR (95%IC)
rs5029930 ^a	-	49	-	0,21	0,25	1,38 (0,80-2,39)
rs5029930/A ^d	0,89	11	0,8	0,42	0,85	1,17 (0,24-5,62)
rs5029930/C ^d	0,11	49	-1,1	0,28	0,22	0,69 (0,37-1,26)
rs5029933 ^a	-	27	-	0,30	0,26	1,54 (0,72-3,30)
rs5029933/A ^r	0,95	27	1,0	0,30	0,17	0,57 (0,26-1,27)
rs5029933/G ^r	-	-	-	-	0,44	0,33 (0,02-5,33)
rs610604 ^a	-	120	-	0,59	0,68	1,01 (0,77-1,49)
rs610604/G ^d	0,37	106	0,2	0,81	0,83	1,05 (0,69-1,59)
rs610604/T ^d	0,63	49	1,4	0,16	0,40	1,34 (0,68-2,67)
rs582757 ^a	-	114	-	0,87	0,92	1,02 (0,72-1,43)
rs582757/C ^d	0,28	106	0,3	0,77	0,62	1,11 (0,73-1,68)
rs582757/T ^d	0,72	30	0,9	0,34	0,71	1,17 (0,51-2,66)

FA: Frequência alélica; FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de *P* obtido no teste de TDT realizado no FBAT. OR (95%IC): *Odds ratio* (95% intervalo de confiança). ^aModelo aditivo-^dModelo dominante. ^rModelo recessivo.

A análise estratificada pelas variáveis de comorbidades autoimunes associadas, idade e forma clínica mostrou um sinal de associação estatisticamente significativo dos marcadores rs610604 e rs582757 concentrado entre pacientes com ausência de comorbidade autoimune associada (Tabela 14). Porém, o número reduzido de famílias informativas dentro desses grupos não permitiu gerar dados com um grande poder estatístico.

Apesar dos quatro marcadores genotipados para o gene do *TNFAIP3* capturarem informações independentes, segundo o critério de r^2 inferior a 0,8, os marcadores rs582757 e rs610604 revelaram um grau considerável de DL ($r^2=0,66$) (Figura 8).

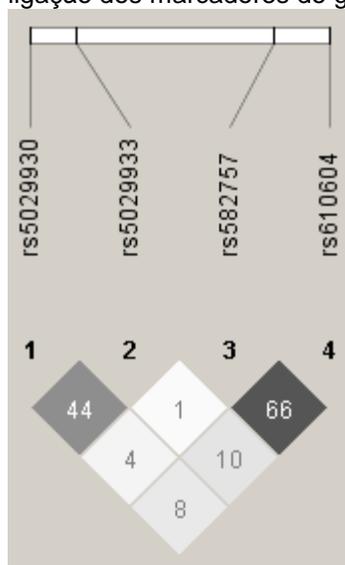
Tabela 14 - Associação dos marcadores do gene *TNFAIP3* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

	FI	Z	P (FBAT)	P (SAS)	OR (95%IC)
rs5029930/A					
Doença Autoimune					
Presença	27	0,5	0,62 ^r	0,72 ^r	0,86 (0,37-1,99)
Ausência	21	1,3	0,19 ^r	0,09 ^r	0,45 (0,18-1,15)
Forma Clínica					
Segmentar	-	-	-	0,10 ^r	0,16 (0,02-1,40)
Não segmentar	43	0,5	0,64 ^r	0,57 ^r	0,84 (0,45-1,56)
Idade					
<25 anos	31	0,9	0,35 ^r	0,58 ^r	0,80 (0,37-1,73)
≥25 anos	19	0,6	0,56 ^r	0,42 ^r	0,64 (0,22-1,88)
rs5029933/A					
Doença Autoimune					
Presença	16	1,1	0,26 ^r	0,26 ^r	0,56 (0,20-1,55)
Ausência	10	0,6	0,55 ^r	0,38 ^r	0,52 (0,12-2,22)
Forma Clínica					
Segmentar	-	-	-	0,38 ^r	0,33 (0,03-3,98)
Não segmentar	24	0,8	0,42 ^r	0,34 ^r	0,66 (0,28-1,55)
Idade					
<25 anos	17	0,5	0,62 ^r	0,53 ^r	0,73 (0,27-1,97)
≥25 anos	11	1,0	0,30 ^r	0,08 ^r	0,24 (0,05-1,21)
rs610604/T					
Doença Autoimune					
Presença	53	0,0	1,00 ^r	0,82 ^r	0,93 (0,50-1,74)
Ausência	21	2,5	0,01^d	0,03^d	5,24 (1,19-23,04)
Forma Clínica					
Segmentar	19	0,5	0,63 ^r	0,70 ^r	0,83 (0,31-2,21)
Não segmentar	41	1,2	0,22 ^d	0,52 ^d	1,27 (0,60-2,68)
Idade					
<25 anos	35	0,8	0,42 ^d	0,94 ^d	0,97 (0,45-2,07)
≥25 anos	40	1,1	0,26 ^r	0,56 ^r	0,80 (0,38-1,70)
rs582757/T					
Doença Autoimune					
Presença	51	0,7	0,50 ^r	0,41 ^r	0,77 (0,41-1,43)
Ausência	16	2,4	0,01^d	0,04^d	8,58 (1,11-66,17)
Forma Clínica					
Segmentar	18	0,1	0,90 ^r	1,00 ^r	1,00 (0,36-2,75)
Não segmentar	25	0,7	0,46 ^d	0,91 ^d	1,06 (0,42-2,67)
Idade					
<25 anos	23	0,5	0,59 ^d	0,81 ^d	0,90 (0,36-2,22)
≥25 anos	39	0,7	0,47 ^r	0,92 ^r	0,97 (0,46-2,00)

FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT. P (SAS): valor de P obtido na regressão logística realizada no SAS. OR (95%IC): Odds ratio (95%

intervalo de confiança). ^dModelo dominante. ^r Modelo recessivo. Em negrito, estão destacados valores de *P* (FBAT) com significância estatística

Figura 8 - Análise do desequilíbrio de ligação dos marcadores do gene *TNFAIP3*.



Valores dentro dos losangos representam a medida do desequilíbrio de ligação quanto ao parâmetro r^2 . A intensidade de cores é proporcional à variação do valor de r^2 . **Fonte:** obtido do programa Haploview.

5.4.4 *IL2*

As frequências alélicas dos *SNPs* do gene *IL2* não se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 15). Além disso, as variações apresentaram uma porcentagem de genotipagem superior a 98%.

Tabela 15 - Porcentagem de genotipagem obtida e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos *SNPs* do gene *IL2*.

	rs2069763	rs2069778	rs2069779
% Gen.	98,2%	98,3%	99,4%
HWE	1,00	0,73	1,00

% Gen.: Porcentagem de genotipagem obtida para cada marcador; HWE: Valor de *p* obtido para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Tabela 16 mostra os resultados da análise de associação obtidos após o TDT. O alelo A da variante rs2069763 foi associado à proteção ao vitiligo na amostra estudada.

Tabela 16 - Análise de associação dos polimorfismos do gene *IL2* com o vitiligo per se.

SNP	FA	FI	Z	P (FBAT)	P (SAS)	OR (95%IC)
rs2069763 ^a	-	112	-	0,02	0,03	1,45 (1,03-2,05)
rs2069763/A ^d	0,33	98	-2,1	0,03	0,05	0,66 (0,43-1,00)
rs2069763/C ^d	0,67	41	1,2	0,24	0,52	1,26 (0,62-2,56)
rs2069778 ^a	-	57	-	1,00	0,90	0,97 (0,58-1,61)
rs2069778A/ ^r	-	-	-	-	0,98	>999 (<0,00->999)
rs2069778G/ ^r	0,90	57	-0,3	0,75	0,63	1,14 (0,66-1,96)
rs2069779 ^a	-	29	-	0,86	0,71	1,14 (0,56-2,34)
rs2069779A/ ^r	-	-	-	-	0,98	>999 (<0,00->999)
rs2069779G/ ^r	0,95	29	-0,2	0,85	0,85	0,93 (0,44-1,96)

FA: Frequência alélica; FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT. OR (95%IC): Odds ratio (95% intervalo de confiança). ^a Modelo aditivo. ^r Modelo recessivo. Em negrito valores de P <0,05.

Ao estratificar os resultados obtidos verificou-se que o sinal de associação anteriormente detectado na análise global (rs2069763 - *IL2*) se concentrou entre pacientes com comorbidade autoimune, forma clínica não segmentar e idade de início tardio (Tabela 17), novamente corroborando com a teoria de que o vitiligo não segmentar é mais fortemente associado a outras doenças autoimunes (394).

Os três *TagSNPs* testados para o gene da *IL2* não apresentaram desequilíbrio de ligação entre elas, ou seja, são *SNPs* independentes (Figura 9).

A análise haplotípica dos marcadores do gene *IL2* com o vitiligo identificou uma evidência de associação entre os alelos do haplótipo número 2 e a proteção ao vitiligo (Tabela 18). Esse haplótipo contém o alelo “A” da variante rs2069763, anteriormente identificada associada à proteção ao vitiligo.

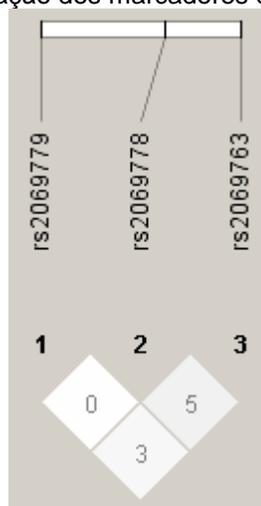
Dentre as variantes que estão em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo analisado (que, portanto, capturam a mesma informação), a única, de acordo com a base de dados do *Ensembl*, com alguma consequência funcional para o gene é a rs45599938. Essa variação está localizada em uma região regulatória da *IL2*, em um sítio de ligação CTCF (*CCCTC-binding factor* – Fator de ligação-CCCTC), podendo também contribuir para o surgimento do vitiligo.

Tabela 17 - Associação dos marcadores do gene *IL2* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

	FI	Z	P (FBAT)	P (SAS)	OR (95%IC)
rs2069763/A					
Doença Autoimune					
Presença	47	-2,3	0,02^d	0,05^d	0,53 (0,28-1,00)
Ausência	61	-1,1	0,26 ^a	0,34 ^a	1,26 (0,78-2,02)
Forma Clínica					
Segmentar	20	-1,4	0,16 ^a	0,17 ^a	1,78 (0,79-4,02)
Não segmentar	82	-2,0	0,04^d	0,05^d	0,64 (0,40-1,00)
Idade					
<25 anos	77	-1,4	0,16 ^a	0,37 ^a	1,21 (0,80-1,84)
≥25 anos	34	-1,9	0,05^d	0,04^d	0,46 (0,21-0,98)
rs2069778/G					
Doença Autoimune					
Presença	24	-0,8	0,43 ^r	0,21 ^r	1,75 (0,73-4,17)
Ausência	32	0,1	0,93 ^r	0,78 ^r	0,90 (0,44-1,85)
Forma Clínica					
Segmentar	-	-	-	0,71 ^r	1,31 (0,30-5,66)
Não segmentar	49	-0,1	0,94 ^r	0,71 ^r	1,12 (0,62-2,00)
Idade					
<25 anos	39	0,7	0,48 ^r	0,56 ^r	0,82 (0,42-1,59)
≥25 anos	20	-1,6	0,11 ^r	0,10 ^r	2,37 (0,84-6,69)
rs2069779/G					
Doença Autoimune					
Presença	11	0,0	1,00 ^r	0,74 ^r	0,80 (0,21-2,98)
Ausência	18	-0,2	0,81 ^r	0,81 ^r	1,12 (0,44-2,87)
Forma Clínica					
Segmentar	-	-	-	0,21 ^r	4,00 (0,45-35,79)
Não segmentar	24	0,4	0,69 ^r	0,52 ^r	0,76 (0,32-1,77)
Idade					
<25 anos	20	0,2	0,82 ^r	0,64 ^r	0,81 (0,32-2,00)
≥25 anos	-	-	-	0,74 ^r	1,25 (0,34-4,65)

FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT. P (SAS): valor de P obtido na regressão logística realizada no SAS. OR (95%IC): Odds ratio (95% intervalo de confiança). ^aModelo aditivo. ^dModelo dominante. ^rModelo recessivo. Em negrito, estão destacados valores de P < 0,05.

Figura 9 - Análise do desequilíbrio de ligação dos marcadores do gene *IL2*.



Valores dentro dos losangos representam a medida do desequilíbrio de ligação quanto ao parâmetro r^2 . A intensidade de cores é proporcional à variação do valor de r^2 . **Fonte:** obtido do programa Haploview.

Tabela 18 - Haplótipo das variantes do gene *IL2*

Nº	Haplótipo			FH	FI	Z	P
	rs2069763	rs2069778	rs2069779				
1	C	G	G	0,51	120	1,8	0,07
2	A	G	G	0,34	108	-2,2	0,02

FH: Frequência do Haplótipo; FI: Número de famílias informativas; Z: Teste Z; P: valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT; Nº: Número do haplótipo. Em negrito, estão destacados valores de P (FBAT) com significância estatística.

5.4.5 *IL21*

As frequências alélicas dos *SNPs* do gene *IL21* não se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 19). Além disso, as variações apresentaram uma porcentagem de genotipagem superior a 98%.

Tabela 19 - Porcentagem de genotipagem obtida e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos *SNPs* do gene *IL21*.

	rs907715	rs2055979	rs4833837
% Gen.	98,1%	98,7%	99,4%
HWE	0,94	0,98	0,16

% Gen.: Porcentagem de genotipagem obtida para cada marcador; HWE: Valor de p obtido para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Tabela 20 mostra os resultados da análise de associação obtidos após o TDT. Não houve associação significativa entre os *SNPs* do gene da *IL21* e o vitiligo *per se*.

Tabela 20 - Análise de associação dos polimorfismos do gene *IL21* com o vitiligo *per se*.

<i>SNP</i>	FA	FI	Z	<i>P</i> (FBAT)	<i>P</i> (SAS)	OR (95%IC)
rs907715 ^a	-	105	-	0,87	0,80	0,96 (0,68-1,34)
rs907715/C ^r	0,67	87	-0,8	0,41	0,57	1,14 (0,72-1,80)
rs907715/T ^r	0,33	54	-0,8	0,43	0,76	1,10 (0,60-2,00)
rs2055979 ^a	-	118	-	0,74	0,83	1,04 (0,74-1,45)
rs2055979A/ ^r	0,32	37	-0,1	0,93	0,78	0,90 (0,44-1,85)
rs2055979C/ ^r	0,68	106	0,3	0,73	0,68	0,92 (0,62-1,37)
rs4833837 ^a	-	95	-	0,32	0,18	1,30 (0,88-1,92)
rs4833837/A ^d	0,73	35	1,1	0,25	0,07	2,34 (0,94-5,86)
rs4833837/G ^d	0,27	80	-0,5	0,62	0,63	0,89 (0,56-1,43)

FA: Frequência alélica; FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; *P* (FBAT): valor de *P* obtido no teste de TDT realizado no FBAT. OR (95%IC): *Odds ratio* (95% intervalo de confiança). ^a Modelo aditivo. ^d Modelo dominante. ^r Modelo recessivo.

Apesar de ter sido verificado um sinal de associação entre o alelo A da variante rs4833837 (*IL21*), e pacientes sem comorbidade autoimune ($p=0,03$) o reduzido número de famílias informativas não garante um poder estatístico suficiente, além disso, o sinal de associação não pode ser detectado nas análises de regressão logística (Tabela 21).

Os resultados obtidos para a análise de desequilíbrio de ligação indicam que as três variações testadas para o gene da *IL21* são independentes (Figura 10).

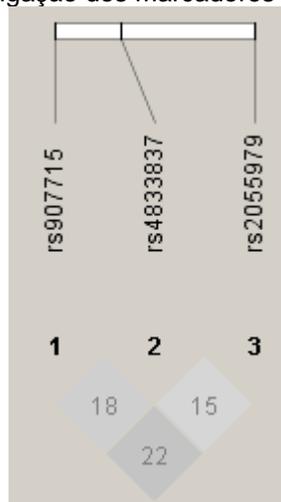
Tabela 21 - Associação dos marcadores do gene *IL21* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

	FI	Z	<i>P</i> (FBAT)	<i>P</i> (SAS)	OR (95%IC)
rs907715/T					
Doença Autoimune					
Presença	41	-0,4	0,69 ^d	0,61 ^d	0,84 (0,44-1,62)
Ausência	31	-0,6	0,57 ^r	0,92 ^r	1,04 (0,48-2,22)
Forma Clínica					
Segmentar	16	0,7	0,51 ^d	0,59 ^d	1,36 (0,45-4,10)
Não segmentar	42	-0,9	0,33 ^r	0,54 ^r	1,25 (0,61-2,57)
Idade					
<25 anos	41	-1,7	0,08 ^r	0,16 ^r	0,75 (0,80-3,80)
≥25 anos	28	1,6	0,12 ^d	0,45 ^d	1,40 (0,58-3,38)

rs2055979/A					
Doença Autoimune					
Presença	49	-0,1	0,89 ^d	0,65 ^d	0,87 (0,48-1,57)
Ausência	24	-0,5	0,60 ^r	0,91 ^r	1,06 (0,42-2,67)
Forma Clínica					
Segmentar	21	-0,7	0,50 ^d	0,48 ^d	0,72 (0,28-1,81)
Não segmentar	87	-0,1	0,96 ^d	0,95 ^d	0,99 (0,63-1,54)
Idade					
<25 anos	74	0,5	0,60 ^d	0,53 ^d	1,17 (0,71-1,93)
≥25 anos	33	-1,3	0,22 ^d	0,13 ^d	0,56 (0,26-1,19)
rs4833837/C					
Doença Autoimune					
Presença	41	-0,2	0,81 ^d	0,93 ^d	0,97 (0,49-1,90)
Ausência	16	-2,1	0,03^r	0,07 ^r	4,04 (0,89-18,32)
Forma Clínica					
Segmentar	-	-	-	0,86 ^d	0,89 (0,23-3,34)
Não segmentar	71	-0,47	0,64 ^d	0,45 ^d	0,82 (0,50-1,35)
Idade					
<25 anos	20	-0,9	0,34 ^r	0,22 ^r	2,26 (0,62-8,25)
≥25 anos	23	-1,2	0,24 ^d	0,23 ^d	0,59 (0,25-1,39)

FI: Número de Famílias Informativas; Z: Teste Z; P (FBAT): valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT. P (SAS): valor de P obtido na regressão logística realizada no SAS. OR (95%IC): Odds ratio (95% intervalo de confiança). ^dModelo dominante. ^rModelo recessivo. Em negrito, estão destacados valores de $P < 0,05$.

Figura 10 - Análise do desequilíbrio de ligação dos marcadores do gene *IL21*.



Valores dentro dos losangos representam a medida do desequilíbrio de ligação quanto ao parâmetro r^2 . A intensidade de cores é proporcional à variação do valor de r^2 . **Fonte:** obtido do programa Haploview.

5.5 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CASO-CONTROLE

Visando testar para replicação os achados positivos de associação, foram genotipados os marcadores rs6545836 do gene *REL* e rs2069763 do gene *IL2* cujos alelos mostraram sinais de associação estatisticamente significativa para o vitiligo *per se* e nas análises estratificadas entre pacientes com comorbidade autoimune e vitiligo não segmentar. Além disso, também foi realizada a genotipagem para as variantes rs842647 e rs842648 do gene *REL* e rs610604 e rs582757 do gene *TNFAIP3* os quais apresentaram sinais de associação nas análises estratificadas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 22, não foi observado sinal de associação com significância estatística entre os marcadores dos genes *REL* e *TNFAIP3* e pacientes com o vitiligo *per se*. Já a variação rs2069763 do gene da *IL2* foi replicada na população caso-controle, com o alelo C conferindo proteção ao vitiligo.

Tabela 22 - Análise de associação entre marcadores dos genes *REL*, *TNFAIP3* e *IL2* para o modelo dominante na população de replicação do tipo caso-controle.

Gene	Marcador	Genótipos	Controle	Caso	P*	OR (95% IC)
REL	rs6545836	AA/AG	46 (41,8)	47 (37,0)	0,450	0,82 (0,48-1,38)
		GG	64 (58,2)	80 (63,0)		
	rs842647	GG/AG	56 (52,8)	71 (55,9)	0,682	1,12 (0,66-1,90)
		GG	50 (47,2)	56 (44,1)		
	rs842648	GG/AG	21 (19,8)	21 (16,3)	0,490	0,79 (0,40-1,54)
		GG	85 (80,2)	108 (83,7)		
TNFAIP3	rs610604	TT/TG	88 (83,0)	102 (79,7)	0,466	0,78 (0,40-1,52)
		GG	18 (17,0)	26 (20,3)		
	rs582757	TT/TC	93 (91,2)	116 (89,9)	0,734	0,86 (0,35-2,09)
		CC	9 (8,8)	13 (10,1)		
IL2	rs2069763	CC/AC	87 (93,5)	104 (81,9)	0,028	0,37 (0,15-0,90)
		AA	6 (6,5)	23 (18,1)		

* Valor de *P* dos genótipos corrigido para sexo e idade. OR (95%IC): *Odds ratio* (95% intervalo de confiança). Em negrito, estão destacados valores de $P < 0,05$.

Para verificar a influência dos fatores não genéticos nos marcadores testados foi realizada a estratificação por presença de comorbidade autoimune, forma clínica e idade de diagnóstico. Apesar do número amostral nessa população ser reduzido, foi observada uma tendência à associação ao realizar a estratificação por forma clínica entre os

marcadores rs6545836 (Tabela 23), rs610604 (Tabela 24) e rs2069763 (Tabela 25) dos genes *REL*, *TNFAIP3* e *IL2* respectivamente.

Tabela 23 - Associação dos marcadores do gene *REL* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

Gene <i>REL</i>					
rs6545836	GG	AA/AG	<i>P</i> (DOM)	<i>P</i> (ADT)	<i>OR</i> (95% IC)
Doença Autoimune					
Presença	30 (60,0)	20 (40,0)	0,412*	0,204*	0,72 (0,33-1,57)
Ausência	44 (66,7)	22 (33,3)			
Forma Clínica					
Segmentar	12 (92,3)	1 (7,70)	0,055*	0,076*	0,13 (0,01-1,05)
Não segmentar	68 (59,6)	46 (40,4)			
Idade					
<25 anos	41 (65,1)	22 (34,9)	0,704**	0,890**	1,15 (0,56-2,38)
≥25 anos	39 (61,9)	24 (38,1)			
rs842648	AA	GG/AG	<i>P</i> (DOM)	<i>P</i> (ADT)	<i>OR</i> (95% IC)
Doença Autoimune					
Presença	42 (82,4)	9 (17,6)	0,685*	0,584*	0,81 (0,30-2,22)
Ausência	57 (85,1)	10 (14,9)			
Forma Clínica					
Segmentar	10 (76,9)	3 (23,1)	0,656*	0,955*	1,42 (0,31-6,56)
Não segmentar	98 (84,5)	18 (15,5)			
Idade					
<25 anos	51 (79,7)	13 (20,3)	0,239**	0,314**	0,56 (0,21-1,47)
≥25 anos	56 (87,5)	8 (12,5)			
rs842647	AA	GG/AG	<i>P</i> (DOM)	<i>P</i> (ADT)	<i>OR</i> (95% IC)
Doença Autoimune					
Presença	24 (47,1)	27 (52,9)	0,413*	0,556*	1,37 (0,64-2,95)
Ausência	27 (41,5)	38 (58,5)			
Forma Clínica					
Segmentar	7 (53,8)	6 (46,2)	0,368*	0,465*	0,55 (0,15-2,01)
Não segmentar	49 (43,0)	65 (57,0)			
Idade					
<25 anos	26 (41,3)	37 (58,7)	0,552**	0,525**	0,80 (0,39-1,64)
≥25 anos	29 (46,0)	34 (54,0)			

*Valor de *P* corrigido para sexo e idade; ** Valor de *P* corrigido para sexo; *P* (DOM): valor de *P* reportado para o modelo genético dominante; *P* (ADT): valor de *P* reportado para o modelo genético aditivo; *OR* (95%IC): *Odds ratio* (95% intervalo de confiança) reportado para o modelo genético dominante. Em negrito, estão destacados valores de *P* com significância *borderline*.

Tabela 24 - Associação dos marcadores do gene *TNFAIP3* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

Gene <i>TNFAIP3</i>					
rs610604	GG	TT/TG	P (DOM)	P (ADT)	OR (95% IC)
Doença Autoimune					
Presença	9 (17,6)	42 (82,4)	0,980*	0,997*	0,99 (0,37-2,62)
Ausência	12 (18,2)	54 (81,8)			
Forma Clínica					
Segmentar	1 (7,7)	12 (92,3)	0,086*	0,081*	7,00 (0,76-64,27)
Não segmentar	25 (21,7)	90 (78,3)			
Idade					
<25 anos	14 (21,9)	50 (78,1)	0,727**	0,867**	1,12 (0,49-2,78)
≥25 anos	12 (19)	51 (81)			
rs582757	CC	TT/TC	P (DOM)	P (ADT)	OR (95% IC)
Doença Autoimune					
Presença	7 (13,7)	44 (86,3)	0,230*	0,177*	2,14 (0,62-7,45)
Ausência	5 (7,5)	62 (92,5)			
Forma Clínica					
Segmentar	1 (7,7)	12 (92,3)	0,570*	0,264*	1,91 (0,20-17,99)
Não segmentar	12 (10,3)	104 (89,7)			
Idade					
<25 anos	5 (7,8)	59 (92,2)	0,376**	0,353**	0,59 (0,18-1,91)
≥25 anos	8 (12,5)	56 (87,5)			

*Valor de *P* corrigido para sexo e idade; ** Valor de *P* corrigido para sexo; *P* (DOM): valor de *P* reportado para o modelo genético dominante; *P* (ADT): valor de *P* reportado para o modelo genético aditivo; *OR* (95%IC): *Odds ratio* (95% intervalo de confiança) reportado para o modelo genético dominante. Em negrito, estão destacados valores de *P* com significância *borderline*.

Tabela 25 - Associação dos marcadores do gene *IL2* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

Gene <i>IL2</i>					
rs2069763	AA	CC/AC	P (DOM)	P (ADT)	OR (95% IC)
Doença Autoimune					
Presença	9 (17,6)	42 (82,4)	0,628*	0,197*	0,79 (0,30-2,06)
Ausência	14 (21,2)	52 (78,8)			
Forma Clínica					
Segmentar	3 (23,1)	10 (76,9)	0,170*	0,053*	0,30 (0,05-1,68)
Não segmentar	20 (17,5)	94 (82,5)			
Idade					
<25 anos	9 (14,3)	54 (85,7)	0,351**	0,122**	0,64 (0,25-1,63)
≥25 anos	13 (20,6)	50 (79,4)			

*Valor de *P* corrigido para sexo e idade; ** Valor de *P* corrigido para sexo; *P* (DOM): valor de *P* reportado para o modelo genético dominante; *P* (ADT): valor de *P* reportado para o modelo genético aditivo; *OR* (95%IC): *Odds ratio* (95% intervalo de confiança) reportado para o modelo genético dominante. Em negrito, estão destacados valores de *P* com significância *borderline*.

6 DISCUSSÃO

Nosso estudo identificou sinais de associação com significância estatística entre marcadores do gene *REL* e *IL2* tanto com o vitiligo *per se* quanto entre pacientes com comorbidade autoimune e a forma não segmentar da doença, dando suporte a nossa hipótese. Porém, para os outros três genes testados não foram identificadas associações com o vitiligo independente de sua forma clínica. Apesar disso, variantes dos genes *TNFAIP3* e *IL21* apresentaram sinais de associação com significância estatística ao realizar as análises estratificadas.

6.1 *CYP27B1*

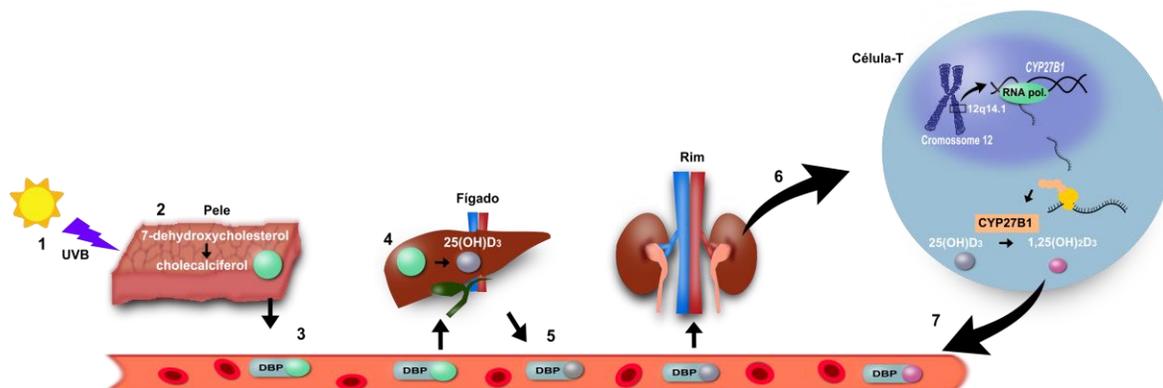
O gene *CYP27B1*, (cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1 [*Homo sapiens (human)*]) NCBI: Gene ID: 1594, *NCBI Reference Sequence*: NG_007076.1) está localizado na região 12q14.1 e apresenta 4.860 pb (pares de bases). Este gene codifica para 25-hidroxivitamina D₃-1 α -hidroxilase (*CYP27B1*), uma enzima mitocondrial P450 que catalisa a conversão de 25-hidroxivitamina D (25OHD) para 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), o metabólito natural da vitamina D ativo, sendo ela a enzima chave na determinação da taxa de 1,25(OH)₂D₃ (Figura 11) (141). Possíveis mecanismos para a função exercida pelo 1,25(OH)₂D₃ na regulação imune têm sido identificados, entre eles: I) a regulação negativa da atividade celular de células-Th1; II) a redução na liberação de citocinas de macrófagos e da produção de anticorpos pelas células-B; e III) a diminuição da liberação de IL-2 e interferon- γ pelas células-T CD4 (395).

Apesar do nível de vitamina D circulante no organismo ser determinado por fatores ambientais como exposição a raios ultravioletas, dietas e suplementos vitamínicos, existem diversos genes envolvidos no controle de vias que sintetizam, transportam e degradam diferentes formas de vitamina D. Sendo assim, variações genéticas também podem levar a diferentes efeitos nas diferenças individuais nos níveis de vitamina D (396).

Pacientes portadores de LES apresentaram níveis significativamente menores de 25-hidroxivitamina D quando comparados com pessoas saudáveis, sugerindo que a deficiência de vitamina D é um possível fator de risco para o desenvolvimento do LES

(397). Além disso, também foi observado que o nível de vitamina D se mostrou significativamente reduzido em pacientes com AR (398) e DM1 (399).

Figura 11 - Mecanismo da relação do gene *CYP27B1* com a vitamina D.



Após exposição aos raios solares, o 7-deidrocolesterol irá absorver os raios UVB [1] e ser convertido a precalciferol na pele. A maior parte do precalciferol eventualmente é transformada em colecalciferol [2], também denominado de vitamina D₃ através de conversão termal. A vitamina D₃ formada na pele será transportada pela corrente sanguínea até o fígado através da proteína de ligação da vitamina D (*Vitamin D Binding Protein, DBP*) [3]. Nos hepatócitos, a vitamina D₃ será convertida em 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃) por quatro principais isoformas de enzimas microsossomais do citocromo P450 (CYP2DII, CYP2D25, CYP3A4, e CYP2R1) [4]. O 25(OH)D₃ será então transportado como um complexo com DBP até os rins [5], onde sofrerá a ação de outra hidroxilase, a 1- α -hidroxilase (CYP27B1), resultando na formação de calcitriol (1,25(OH)₂D₃) [6], sendo esta considerada a forma ativa da vitamina D, a qual será transportada para o corpo enquanto ligada ao DBP [7]. **Fonte:** a autora.

Estudos de associação entre variantes do gene *CYP27B1* e a concentração de 25(OH)D têm mostrado resultados divergentes. Foi identificada associação entre o rs4646536 com a concentração de 25(OH)D em um estudo analisando a esclerose múltipla em gêmeos canadenses (400). Além disso, a variante rs10877012, que está em DL com a rs4646536 ($r^2=1,0$; $D'=1,0$) foi associada com um aumento nos níveis de 25(OH)D em afro-americanos (396). Porém, essa associação não pôde ser replicada em estudos envolvendo alemães (401) e afro-americanos (402).

Apesar de não ser verificada associação com significância estatística entre o *SNP* rs4646536 neste trabalho, estudos mostraram seu impacto em doenças autoimunes, como com a esclerose múltipla na população sueca (403) e com o DM1 em duas amostras populacionais (caso-controle e baseado em família) da Grã-Bretanha (137). Já o polimorfismo rs10877012 foi associado com doença de Addison, tireoidismo de Hashimoto, doença de Graves e DM1 (141). A variação genética rs703842, em DL com

o *SNP* analisado no presente estudo ($r^2=1,0$; $D'=1,0$) foi associado com a esclerose múltipla em um *GWAS* com população de ascendência europeia (404). Esse achado foi posteriormente replicado na população de chineses han (405), norte-americanos e britânicos (406).

6.2 *REL*

O gene *REL* (*REL proto-oncogene, NF- κ B subunit [Homo sapiens (human)]*) NCBI: Gene ID: 5966), localizado na região 2p16.1 contendo 46.677 pb, codifica para a proteína c-Rel, membro da família de fatores de transcrição NF- κ B (factor nuclear kappa B, em inglês, *Nuclear factor kappa B*). Estes fatores apresentam função na coordenação da expressão de vários genes que controlam as respostas imunes e a autoimunidade (Figura 12a) (407). Todos os membros da família NF- κ B compartilham um domínio de homologia Rel, altamente conservado, o qual é composto por aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, responsáveis pela ligação do DNA, dimerização e interações com o I κ B (408).

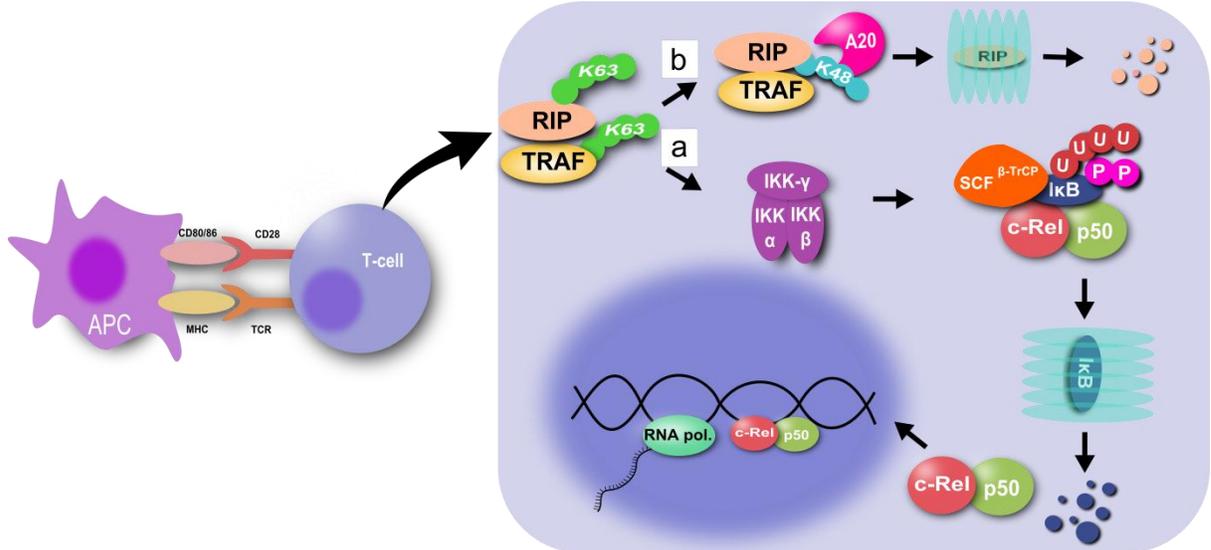
As variantes rs6545835 e rs34695944 que estão em DL com ambos os polimorfismos analisados (rs6545836 e rs13031237, respectivamente) mostraram sinal de associação com a artrite reumatoide (409, 410). Também foi verificada associação entre essa doença e as variantes rs842647 (409) e rs13031237 (213). Outras doenças que, apesar de não estarem associadas ao vitiligo apresentam uma base autoimune, também apresentaram associação com a variação rs842647. Essa variante foi associada com a doença celíaca (411-413), colite ulcerativa (414) e doença de Behcet (415). Já a variante rs13031237 não mostrou associação significativa com a doença de Behcet (415).

A variante rs6545836 associada ao vitiligo está localizada no intron 3 do gene *REL*. A Figura 13 foi criada com o intuito de verificar se as variantes em desequilíbrio de ligação com o *SNP* rs6545836 estão localizadas em alguma região funcional do genoma. Todas as variantes que estão em DL com os *SNPs* genotipados encontram-se em regiões intrônicas ou intergênicas tanto do gene *REL* quanto dos genes vizinhos a ele. Importante ressaltar também que os quatro *Tag SNPs* testados estão em DL com marcadores localizados em genes vizinhos ao gene *REL*, podendo levar a discussão de qual seria o

real gene de suscetibilidade ao vitiligo. Como nossa estratégia de seleção de marcadores foi feita com o intuito de realizar a cobertura física completa dos genes candidatos, grande parte dos *SNPs* selecionados encontram-se em regiões não codificantes do genoma. Porém, sabe-se que essas regiões podem desempenhar importantes funções no controle de expressão gênica, já que as mesmas podem estar localizadas em regiões de potenciadores (*enhancer*) ou supressores (416). Além disso, as variantes intônicas podem estar localizadas em regiões que contêm sequências de micro-RNAs não traduzidas que têm funções regulatórias (417).

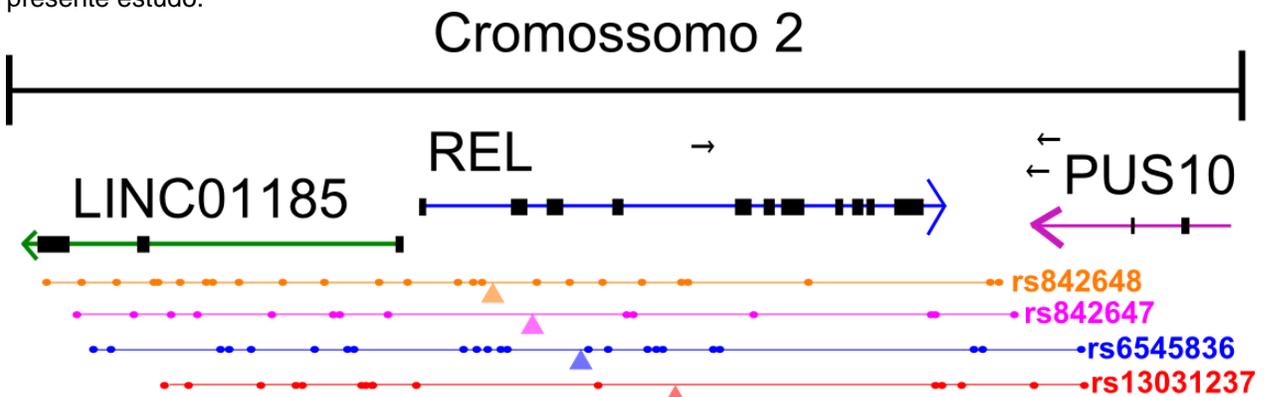
A análise de previsão de impacto funcional identificou uma correlação entre a variante rs6545836 com a expressão do gene *AHSA2*. Esse gene codifica para uma co-chaperona que estimula a atividade ATPase da proteína de choque térmico *HSP90* (*UniProtKB – Q71910*). As proteínas de choque térmico são as principais candidatas para desencadear o estresse oxidativo na pele, levando à ativação da imunidade inata (418). Apesar de o principal *DAMP* (do inglês, Padrão Molecular Associado ao Dano) associado ao vitiligo ser a *HSP70* (418-420), estudos também identificaram alterações de expressão de *HSP90* em pacientes com vitiligo. Frediani e colaboradores identificaram um aumento significativo na contagem de linfócitos e na expressão de *HSPs* (70 e 90) na superfície dessas células em pacientes com vitiligo (421). Essas linhas de evidências sugerem um mecanismo regulatório pelo qual essa variante possa afetar a suscetibilidade ao vitiligo.

Figura 12 - Expressão gênica associada às respostas imunes e autoimunidade mediada pelas proteínas c-Rel e A20.



Nos linfócitos-T, a via canônica do NF-κB é desencadeada pela interação de TCR e CD28. **a)** Essa interação irá estimular TRAFs (fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (TNF)), que se associam à proteína interativa do receptor (RIP), ativando o complexo IKK, uma quinase serina-específica composto por três unidades: IKK-α (IKK1), IKK-β (IKK2) e IKK-γ (NEMO). Essa ativação resulta na fosforilação do inibidor biológico natural, IκB, recrutamento do complexo ubiquitina ligase SCFβ-TrCP, rápida poliubiquitinação e subsequente degradação das proteínas inibitórias IκB pelo proteossomo 26S. Uma vez livres das moléculas IκB, os dímeros p65/50 e c-Rel/p50 participam da regulação transcricional de genes distintos envolvidos em funções da imunidade adaptativa. **b)** A transdução de sinal dos receptores de superfície celular para o complexo IKK pode ser inibida pela proteína A20. Essa proteína remove as ubiquitinas ativadoras (K63) de RIP e TRAFs que inativa a função de sinalização de RIP e adiciona ubiquitinas (K48) a estas moléculas para marcá-las para degradação proteossômica. **Fonte:** a autora.

Figura 13 - Desenho esquemático da localização genômica do gene *REL* e das variantes analisadas no presente estudo.



A parte superior da figura traz a localização cromossômica analisada. A parte inferior mostra a posição do gene *REL*, bem como os genes vizinhos a ele e alguns pseudogenes. Logo abaixo estão identificados os quatro polimorfismos analisados no presente estudo (representados em triângulos), bem como as variantes que estão em desequilíbrio de ligação com esses SNPs (representados em bolinhas). **Fonte:** a autora, dados obtidos do *Genbank – NCBI* e *Ensembl*.

6.3 TNFAIP3

O gene *TNFAIP3* (*TNF alpha induced protein 3 [Homo sapiens (human)]*) NCBI: Gene ID: 7128), localizado na região 6q23 codifica para a proteína A20, uma ubiquitina ligase (354). Essa proteína é necessária para inibir a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Figura 12b), responsável pela regulação de expressão de vários genes que controlam as respostas imunes e a autoimunidade (407). Sendo assim, defeitos na expressão da proteína A20 podem acarretar em disfunções inflamatórias e autoimunes (422). Apesar de terem sido encontradas associações genéticas entre polimorfismos localizados no gene *TNFAIP3* com SLE (348, 350, 352-354, 356, 357, 423), AR (347-351), DM1 (346), doença de Graves (362) e psoríase (358-361), não foram identificadas associações estatisticamente significativas com o vitiligo *per se* no presente estudo.

6.4 IL2 E IL21

O gene *IL2* (*interleukin 2 [Homo sapiens (human)]*) NCBI: Gene ID: 3558, *NCBI Reference Sequence*: NG_016779) está localizado na região 4q27, possui 5.026 pb. Já o gene *IL21* (*interleukin 21 [Homo sapiens (human)]*) NCBI: Gene ID: 59067, *NCBI Reference Sequence*: NG_031966.1), localizado na mesma região 4q26-q27, possui 8.430 pb. Estes genes codificam para citocinas contidas em uma das famílias mais importantes de citocinas, as do tipo 1, que compreende grande parte das interleucinas (424). Membros dessa família, que incluem IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 e IL21, compartilham um receptor comum de citocina de cadeia- γ (424). Esta molécula faz parte dos receptores das interleucinas que medeiam a transdução de sinal, sendo a especificidade dessa transdução, para cada citocina, determinada pelas proteínas associadas com a cadeia- γ compartilhada (425).

A Interleucina 2 (IL2) é produzida principalmente por células CD4 ativadas, podendo também ter sua expressão através de células-T naive CD8, células dendríticas e do timo (426). A IL2 foi primeiramente descrita como um fator de crescimento e sobrevivência capaz de induzir a proliferação de células-T (Figura 14), e a eliminação da IL2 em células-T em proliferação pode conduzir a morte celular induzida pela retirada da

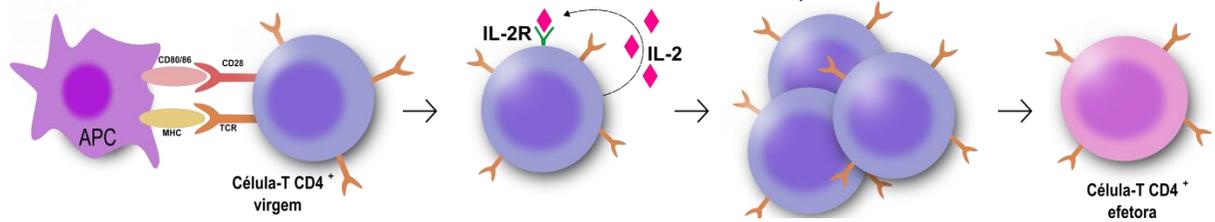
citocina (427). Além disso, estudos clínicos demonstraram a importância dessa citocina no tratamento do vitiligo. A primeira linha de tratamento para o vitiligo faz uso de inibidores de calcineurina, como o *Tacrolimus* tópico (428). Esse medicamento controla bloqueia a transcrição do gene da *IL2*, inibindo assim a produção da citocina pró-inflamatória e impedindo a proliferação de linfócitos T citotóxicos.

A Interleucina 21 (IL21) também é produzida principalmente por células-T CD4 e regula as funções das células-T, B e NK (*Natural Killer*) (429). Por pertencerem à mesma família de citocinas, a IL2 e a IL21 compartilham um alto grau de homologia, apresentando funções pleiotrópicas nas células imunes (430) (Figura 15).

A interleucina 2 se liga em seu receptor (IL-2R) para promover o crescimento e proliferação de células-T, apresentando uma importante função na geração da resposta imune. O IL-2R pode também ser liberado no soro (sIL-2R), tornando possível a mensuração de sua concentração. Quando comparado com 40 controles foi identificado um aumento estatisticamente significativo entre os níveis de sIL-2R e 40 pacientes com VNS (431). Além disso, também foi verificado um aumento nos níveis de IL2 em indivíduos com vitiligo quando comparado à controles (432, 433).

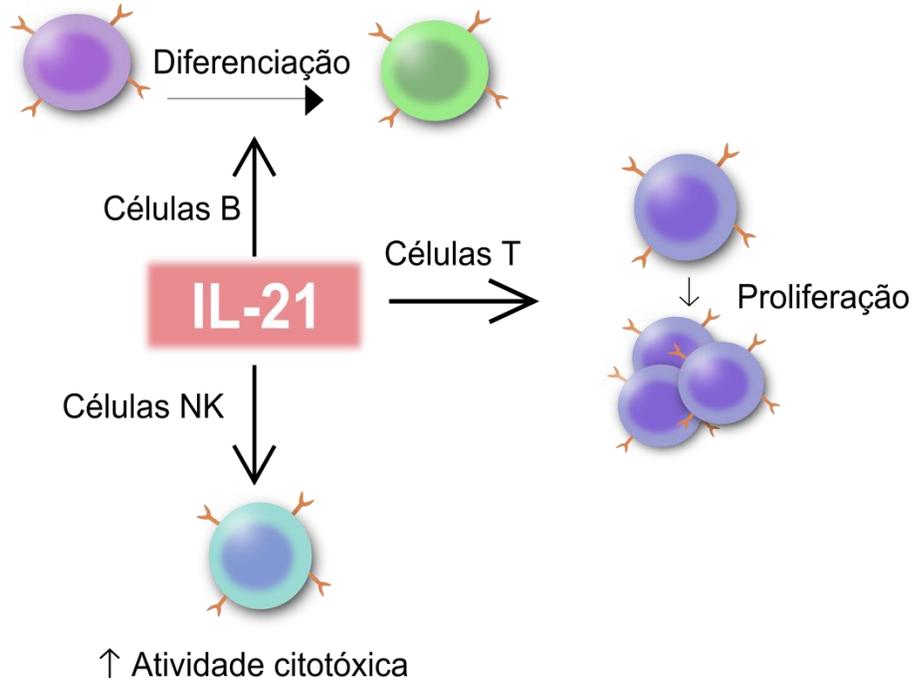
A variação rs2069763, que foi associada ao vitiligo na presença de comorbidade autoimune, está localizada no exon 1 do gene da *IL2* (Figura 16), porém não gera alteração de aminoácido leucina. Apesar de ser uma variação sinônima, esta pode desencadear mudanças nos níveis de proteínas e em suas conformações, através da alteração da estrutura local e global do mRNA, influenciando a cinética da tradução e contribuindo para o surgimento de doenças (434). Em um estudo avaliando o efeito de variações genéticas do gene *IL2* foi identificado que o *SNP* rs2069763 foi associado ao aumento da suscetibilidade de hepatite autoimune (435).

Figura 14 - Relação da IL2 na expansão e diferenciação de células T.



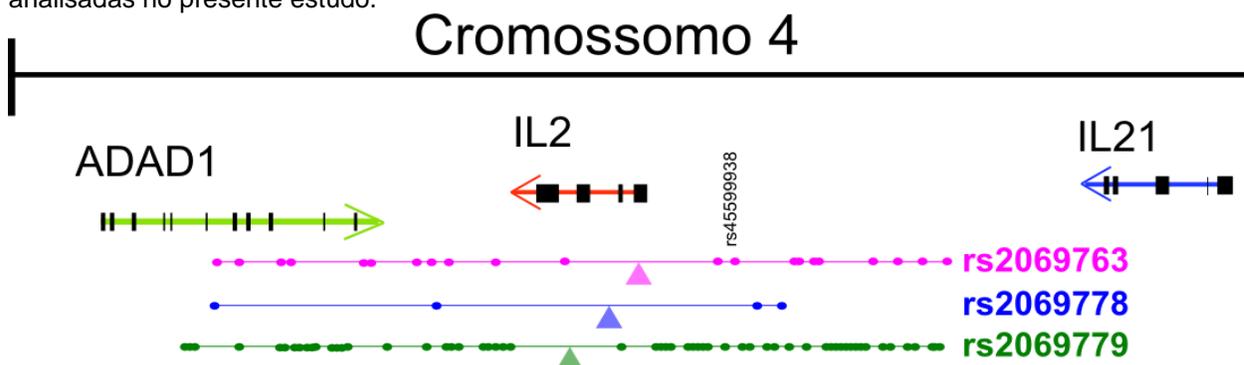
A ativação de células T através do receptor de células T e moléculas coestimuladoras (CD28) leva a produção de IL2 e a expressão do receptor de IL-2 (IL-2R). A interação entre a IL2 e seu receptor leva à expansão clonal e diferenciação em células efetoras. **Fonte:** a autora.

Figura 15 - Funções exercidas pela IL21.



Dentre as funções exercidas pela IL21, produzida por células T ativadas, estão a coordenação da diferenciação de células B, aumento da proliferação de células T e aumento da atividade citotóxica de células NK. **Fonte:** a autora.

Figura 16 - Desenho esquemático da localização genômica dos genes *IL2* e *IL21* e das variantes analisadas no presente estudo.



A parte superior da figura traz a localização cromossômica analisada. A parte inferior mostra a posição do gene *IL2*, bem como os genes vizinhos a ele. Logo abaixo estão identificadas as variantes analisadas no presente estudo para o gene da *IL2*, bem como as variantes que estão em desequilíbrio de ligação com esses *SNPs*. **Fonte:** a autora, dados obtidos do *Genbank* – *NCBI* e *Ensembl*.

Outras variantes que estão em DL com o rs2069763 são os polimorfismos rs2069772, *SNP* previamente associado com outras doenças de caráter autoimune, como rinite alérgica (436) e alergia ao leite de vaca (437); rs3136534, associado com a doença de Addison (197); e rs12499753 e rs17388568, localizados no gene *ADAD1*, foram associados com o LES (194) e DM1 (438), respectivamente.

Estudos de associação genética que realizam múltiplos testes costumam fazer correções para evitar associações espúrias. Para esse estudo, no qual foram genotipados 15 marcadores, o valor de significância considerada após a correção de Bonferroni seria de 0,003 (valor de significância de 0,05 dividido pelo número de testes realizados – 15 *SNPs*). Porém, essas correções são de natureza exclusivamente estatística e conservadora; por esse motivo, consideramos o estudo de replicação na população caso-controle uma melhor estratégia para evitar associações ao acaso.

6.5 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO CASO-CONTROLE

Uma possível explicação para a falta de replicação entre o marcador rs6545836 do gene *REL* e o vitiligo pode ser a diferença de idade de início da doença entre as duas populações estudadas, já que o sinal de associação detectado na população de famílias se concentrou entre pacientes com idade de início precoce da doença, e a população de replicação apresenta uma manifestação do vitiligo mais tardia.

O marcador que apresentou replicação na análise de associação com o vitiligo *per se* foi o rs2069763 do gene da *IL2*, porém, esse resultado na população caso-controle foi diferente do observado na população de famílias. Dentro dos trios familiares, o alelo A se mostrou como fator de proteção em pacientes com vitiligo com comorbidade autoimune e forma clínica não segmentar, enquanto que na população de replicação o alelo C foi associado a proteção ao vitiligo. Uma possível explicação para os sinais de associações opostos nas diferentes populações seria que diferentes alelos de uma mesma variação podem levar à manifestação de diferentes formas clínicas do vitiligo. Porém, no presente estudo, devido ao baixo número amostral a estratificação pelas covariáveis não genéticas na população caso-controle não gerou dados com grande poder estatístico, não sendo identificada em qual das formas clínicas o sinal de associação foi detectado (Tabela 26).

Esse fenômeno de inversão, conhecido como *Flip-Flop*, tem sido observado em alguns estudos de associação genética e parece ocorrer quando o alelo de risco é relativamente comum (439), o que é observado para a variante rs2069763 no presente estudo. Além disso, para doenças genéticas complexas, a interação entre diversos *loci* e fatores ambientais podem influenciar na sua etiologia. Sendo assim, outra possível explicação do fenômeno de *Flip-Flop* é o efeito *multilocus* (440). Isso pode ocorrer quando a associação de determinado *SNP* não seja de fato a causal, mas possa estar em desequilíbrio de ligação com a variante causal (440). Variações nos padrões de desequilíbrio de ligação são observados em populações com diferentes *backgrounds* genéticos, podendo, portanto, originar resultados ambíguos (439). Apesar de ambas as populações (baseada em famílias e caso-controle) deste estudo terem sido recrutadas na mesma região geográfica, devido a miscigenação da população brasileira, pode haver uma variação nos padrões de desequilíbrio de ligação entre as populações, podendo ocasionar os sinais de associação opostos.

6.6 VITILIGO COMO MODELO DE AUTOIMUNIDADE

Por ser uma doença complexa, o controle da ocorrência do vitiligo, assim como em outras doenças autoimunes, envolve fatores de risco genéticos e ambientais. Porém,

mesmo os fatores de risco ambientais parecem sempre ocorrer em resposta à algum fator de suscetibilidade genética, não sendo possível analisá-los de forma independente.

Apesar do presente estudo reforçar a existência de um compartilhamento genético entre várias doenças autoimunes, todas elas se manifestam de maneira diferente, apresentando sinais clínicos específicos para cada desordem. Possivelmente, variações genéticas em *loci* que codificam para importantes moléculas do sistema imune resultarão em respostas imunológicas exacerbadas em diferentes tecidos, de acordo com os estímulos presentes em cada microambiente, resultando, portanto, nas diferentes doenças autoimunes. Gutierrez-Achury e colaboradores fizeram um estudo avaliando o compartilhamento genético entre a doença celíaca e AR (441). Nesse estudo, os pesquisadores compararam o enriquecimento celular dos *loci* específicos para cada doença com aqueles compartilhados por ambas. Como resultado, ao analisar os *SNPs* compartilhados entre as doenças, foi identificado um enriquecimento do grupo celular envolvido nos estágios iniciais das respostas imunes, como na resposta imune inata (441). Já na análise de enriquecimento para os *loci* específicos para cada doença, as variantes indicaram uma função em vias mais especializadas. Os pesquisadores então sugeriram que fatores comuns entre as doenças autoimunes podem estar envolvidos nos estágios iniciais da patogênese da autoimunidade (441).

Nosso estudo tem como hipótese a existência de uma base genética comum regulando o controle de doenças autoimunes. Nossos achados dão suporte a essa hipótese, uma vez que genes previamente associados com outras doenças autoimunes frequentemente relacionadas ao vitiligo também mostraram associação para a desordem pigmentar estudada.

Importante, nossos resultados mostraram-se dependentes da forma clínica do vitiligo, que portanto devem ser consideradas cuidadosamente no contexto da utilização da doença como marcadora de autoimunidade. Diversos estudos epidemiológicos têm sugerido que as duas formas clínicas do vitiligo, na realidade, são duas desordens diferentes. Um estudo publicado no ano de 2006 com pacientes egípcios identificou diferenças quanto a idade de início do vitiligo, presença de histórico familiar positivo e presença de doenças autoimunes ao comparar pacientes com as duas principais formas clínicas do vitiligo (442). Já no ano de 2010 um estudo envolvendo crianças francesas

portadoras de vitiligo também identificou diferenças nas características clínicas entre o vitiligo segmentar e o vitiligo não segmentar (443). Castro e colaboradores, em 2014, também verificaram diferenças nas variáveis clínicas entre pacientes brasileiros (444). Nesse estudo as variáveis de presença de comorbidades autoimunes, histórico familiar positivo e idade de início mais tardio se concentraram entre pacientes com a forma não segmentar da doença (444). Apesar da forma clínica segmentar não se apresentar com frequência associada a outras comorbidades autoimunes, a inclusão de pacientes com esse fenótipo é importante para verificar a presença de alguma resposta imune contra o melanócito. Nossos resultados não puderam confirmar esse efeito, uma vez que, ao realizar as análises estratificadas, o sinal de associação foi sempre detectado apenas para uma das formas clínicas de maneira independente. Apesar disso, nossos achados corroboram com as diferenças nas características clínicas de acordo com a classificação do vitiligo uma vez que ao estratificar as associações dos genes *REL* e *IL2* verificou-se que ambas se concentraram entre pacientes com comorbidade autoimune e forma clínica não segmentar.

6.7 ANÁLISE DE INTERAÇÃO GÊNICA

Foi realizada uma análise haplotípica entre as duas variantes dos genes *REL* e *IL2* que mostraram associação ao vitiligo *per se* na população de descoberta, ambas com o alelo A conferindo proteção à desordem pigmentar estudada. O haplótipo número 1, que contém os alelos de risco para ambas as variantes, mostrou um sinal de associação estatisticamente significativa conferindo suscetibilidade ao vitiligo (Tabela 26). Além disso, o haplótipo 3 se mostrou associado à proteção ao vitiligo. Esse haplótipo contém o alelo de proteção da variante rs6545836 e o de risco para a variante rs2069763. Já o haplótipo 2, que não se mostrou associado ao vitiligo, apresenta os alelos de risco e proteção para as variantes dos genes *REL* e *IL2*, respectivamente. Apesar da variante do gene *REL* não mostrar replicação na amostra caso-controle, possivelmente devido à diferença de idade, esses resultados haplotípicos sugerem um forte impacto da variante rs6545836 no controle da suscetibilidade genética ao vitiligo.

Tabela 26 - Haplótipo das variantes rs6545836 do gene *REL* e rs2069763 do gene *IL2*

Haplótipo		FH	FI	Z	P	
Nº	rs6545836	rs2069763				
1	G	C	0,51	119	3,4	0,0006
2	G	A	0,29	103	-1,4	0,16
3	A	C	0,14	67	-2,1	0,04

FH: Frequência do Haplótipo; FI: Número de famílias informativas; Z: Teste Z; P: valor de P obtido no teste de TDT realizado no FBAT; N°: Número do haplótipo. Em negrito, estão destacados valores de P (FBAT) com significância estatística.

Visando identificar a presença de alguma interação principalmente entre os genes *REL* e *IL2*, mas também entre os 30 genes compartilhados entre as doenças autoimunes e o vitiligo, foi realizada uma análise primária e superficial utilizando o GeneMANIA (<https://genemania.org/>) (445). Esse programa realiza uma busca em diversas bases de dados biológicos, que estão publicamente disponíveis, para verificar interações entre os genes de interesse e outros genes que podem estar relacionados a eles. Diversas categorias de interações podem ser encontradas entre os genes, dentre elas estão:

- Co-expressão: Dois genes estarão ligados caso seus níveis de expressão sejam similares em uma mesma condição dentro de estudos de expressão gênica;
- Interação física: Dois produtos gênicos estarão ligados caso seja identificada uma interação proteína-proteína;
- Interação genética: Dois genes serão funcionalmente associados se os efeitos ao se perturbar um gene forem verificados modificando um segundo gene;
- Similaridade de domínio proteico: Dois produtos gênicos estarão ligados caso apresentem o mesmo domínio proteico;
- Co-localização: Refere-se aos genes que são expressos em um mesmo tecido ou à proteínas encontradas em uma mesma localização;
- Vias compartilhadas: Dois produtos gênicos estarão ligados caso participem de uma mesma reação dentro de uma via metabólica;

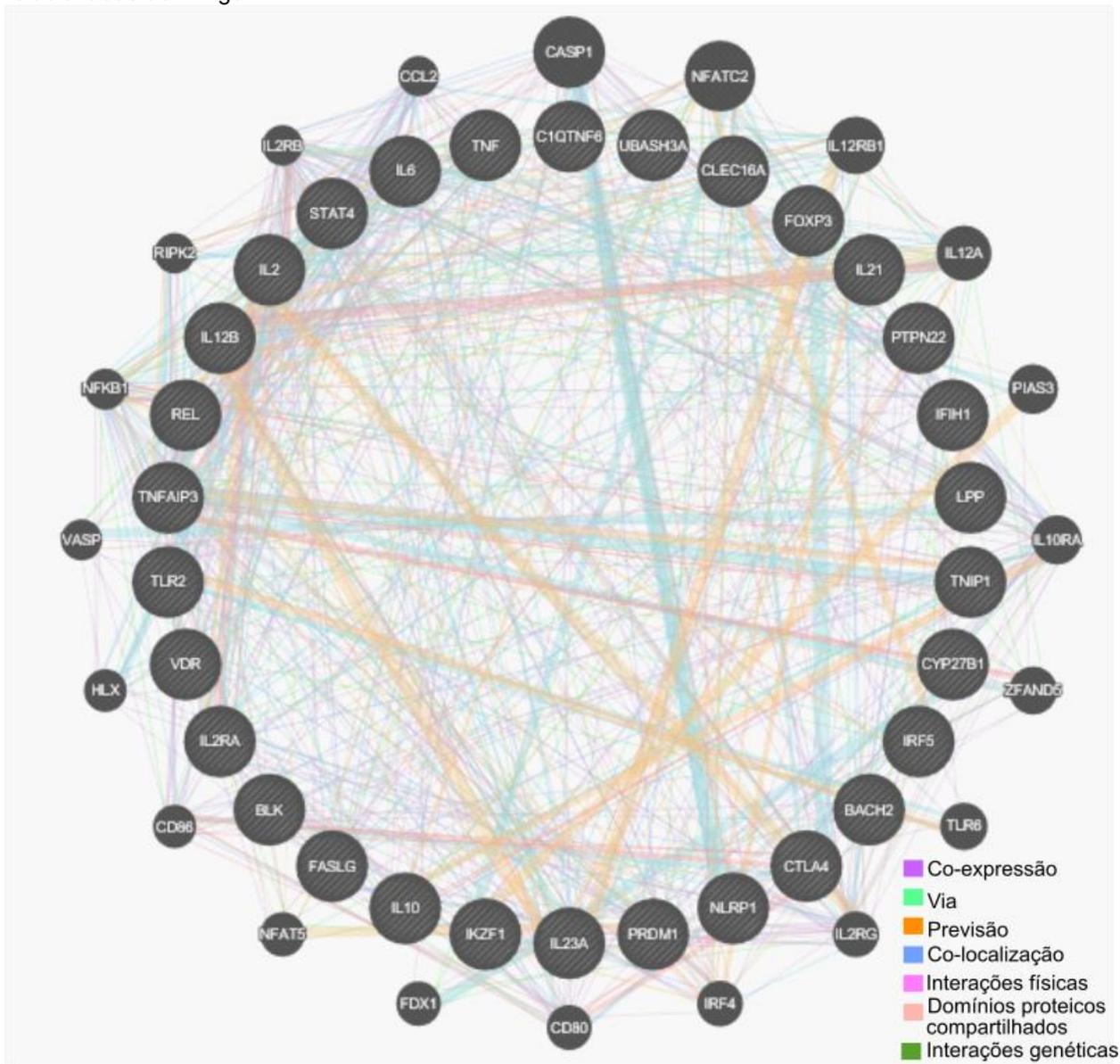
- Relações funcionais previstas: É previsto que haja interação entre duas proteínas se é conhecido que os seus ortólogos interajam em outro organismo.

Os resultados obtidos pelo programa GeneMania identificaram uma grande rede de interação entre os 30 genes. Cada um deles interagiu com pelo menos dois outros genes da lista e apenas cinco deles (17%) interagiram com menos de 5 genes (Figura 17). A maior parte das interações foram de co-expressão seguida por vias metabólicas compartilhadas, sugerindo, portanto, que diferentes doenças autoimunes compartilham vários *loci* que parecem estar sob influência de fatores de expressão semelhantes e seus produtos gênicos participando de uma mesma via metabólica.

Focando nos cinco genes candidatos desse estudo foram identificadas interações de co-expressão entre os genes *TNFAIP3* e *REL* e os genes *IL2* e *IL21*. Já entre os genes *REL* e *IL2*, que mostraram resultados semelhantes no presente estudo, correlacionaram-se quanto à interações entre vias metabólicas compartilhadas e relações funcionais previstas (Figura 18).

O gene *REL* codifica para a proteína c-Rel que é um fator de transcrição envolvido na via NF- κ B. A proteína c-Rel possui certa preferência pelo local ideal de ligação ao DNA para uma sequência alvo, sendo assim, há certa preferência por alguns genes alvos para c-Rel (446). Baseado nas funções específicas de c-Rel, grande parte desses genes estão envolvidos na proliferação, sobrevivência ou função de células imunes (446). Dentre os genes alvos com função no crescimento e proliferação celular está o gene da *IL2*, sendo a presença de c-Rel indispensável para o bom funcionamento de células Th1 (446, 447). O c-Rel controla a transcrição do gene *IL2* através do remodelamento da estrutura de cromatina do *locus* tornando-o permissivo para a transcrição (446).

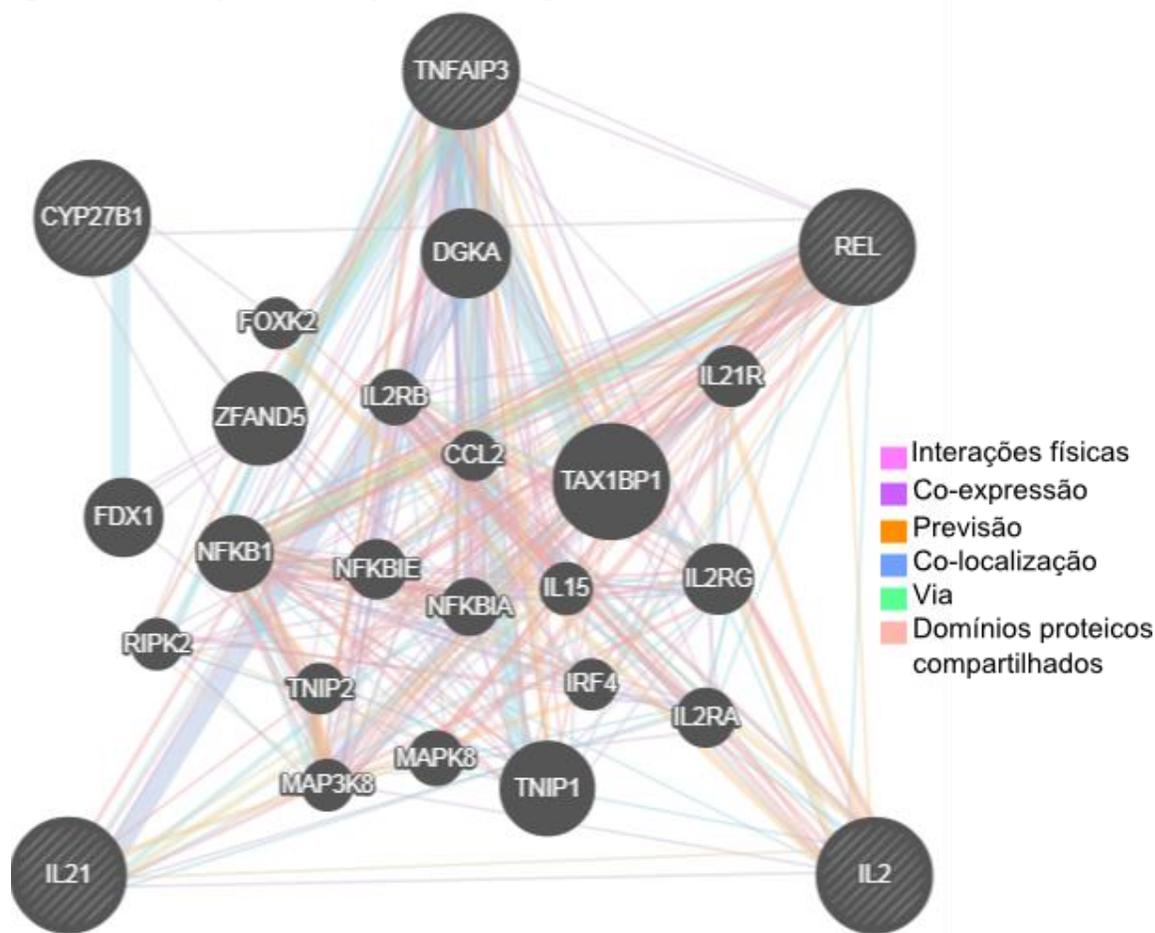
Figura 17 - Ilustração da interação entre os 30 genes associados à doenças autoimunes frequentemente relacionadas ao vitiligo



Os 30 genes candidatos estão representados pelos círculos hashurados.

Fonte: GeneMANIA (<https://genemania.org/>).

Figura 18 - Ilustração da interação entre os 5 genes candidatos testados.

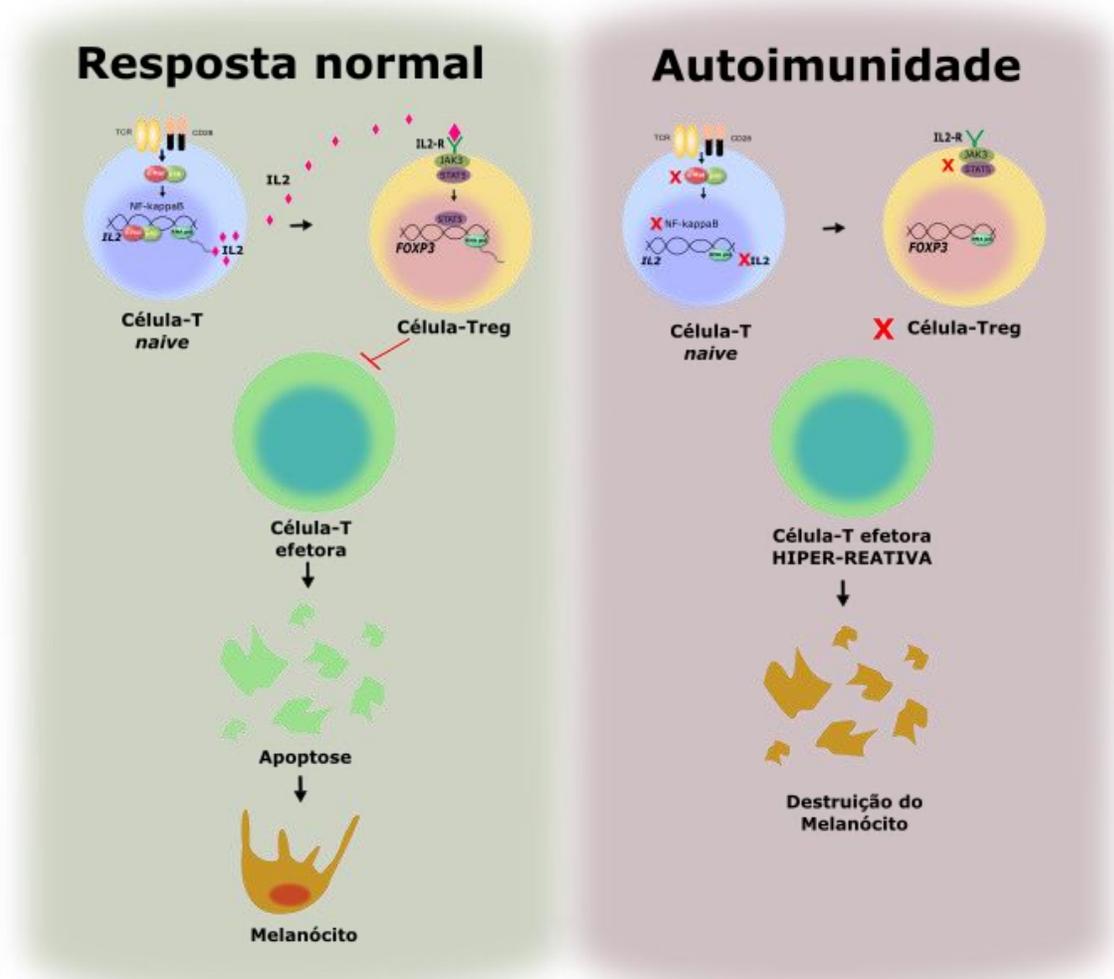


Os 5 genes candidatos testados no presente estudo estão representados pelos círculos hashurados.

Fonte: GeneMANIA (<https://genemania.org/>).

As interações entre os genes *IL2* e *REL* podem ser verificadas por diversos estudos que utilizam camundongos com o gene *REL* nocauteado. Nesses estudos foi identificado que as células-T desses camundongos mostraram uma expressão de *IL2*, induzida por anti-CD3/CD28, reduzida (447, 448). Além disso, também foi verificada uma drástica redução nos níveis séricos de *IL2* nos camundongos deficientes em c-Rel (447). Sendo assim, variações genéticas que levem a uma alteração nos níveis da proteína c-Rel, poderão resultar na ausência de expressão de *IL2*, desencadeando uma falta de células-T regulatórias (Tregs), gerando uma hiperatividade de células T efetoras contra o melanócito, levando à sua destruição (Figura 19).

Figura 19. Representação esquemática do possível mecanismo de interação entre *REL* e *IL2* na resposta imune contra o melanócito.



Após a interação entre TCR e CD28, a via dos fatores de transcrição NF-κB será ativada e o dímero formado por p-50 e c-Rel (codificado pelo gene *REL*) participará do processo de transcrição do gene da *IL2*. Essa citocina se ligará em seu receptor, fazendo com que FOXP3 seja expresso, dando origem a uma célula-T reguladora. Essa célula fará a seleção negativa de células-T efetoras que atacariam os melanócitos. Na presença de alguma variação genética, os níveis de c-Rel podem ser diminuídos, desencadeando a falta de IL2 e, por consequência, de células-T reguladoras, levando à destruição dos melanócitos pelas células-T hiper-reativas. **Fonte:** a autora.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem um provável impacto dos genes *REL* e *IL2* no controle da suscetibilidade ao vitiligo, uma vez que variações genéticas desses genes foram associadas à desordem pigmentar. Um achado interessante foi que o alelo A da variante rs2069763 do gene da *IL2* na população de famílias se mostrou como fator de proteção em pacientes com vitiligo, enquanto que na população de replicação o alelo C conferiu proteção à desordem pigmentar. Apesar da falta de identificação de qual forma clínica o alelo esteve associado na população caso-controle, esses achados indicam uma tendência de diferentes alelos de uma mesma variação podem levar à manifestação de diferentes formas clínicas do vitiligo. Além disso, os resultados sugerem que a variante rs6545836 do gene *REL* pode apresentar um possível impacto na idade de início do vitiligo, já que na população de descoberta o sinal de associação detectado se concentrou entre os pacientes com idade precoce do aparecimento da doença, e o achado não pode ser replicado na população caso-controle, que apresentou uma idade de início tardia.

As demais variantes dos genes estudados não mostraram associação com significância estatística com o vitiligo *per se*. Porém, ao estratificar os resultados em subgrupos pela presença de comorbidade autoimune, forma clínica da doença e idade de diagnóstico, foram identificadas associações entre marcadores dos genes *REL* e *TNFAIP3* entre pacientes sem comorbidade autoimune e forma clínica segmentar.

A principal limitação identificada pelo presente estudo refere-se ao baixo número amostral da população de caso-controle bem como a diferença entre as amostras populacionais, impedindo a replicação dos achados. Além disso, o reduzido número de pacientes com a forma segmentar da doença em ambas as amostras populacionais, também impediu uma melhor interpretação dos resultados obtidos. Apesar da nossa seleção de marcadores ser livre de hipóteses, não sendo, portanto, baseada na função de cada variante, essa estratégia apresenta como

desvantagem o fato de que a maioria das variantes selecionadas estão localizadas em regiões intrônicas dos genes, tendo seu impacto funcional desconhecido.

Por envolver diversos genes, fatores ambientais e a interação entre eles, o estudo da etiologia de doenças complexas é um desafio. Sendo assim, os estudos genéticos têm um importante papel na busca pelos fatores de risco dessas doenças. Nesse trabalho pudemos contribuir com resultados que sugerem um provável impacto de dois novos genes (*REL* e *IL2*) na suscetibilidade do vitiligo. Além disso, pudemos reforçar a hipótese autoimune para a etiologia dessa desordem pigmentar.

Os estudos de validação em diferentes populações são fundamentais para comprovar o papel de um gene na manifestação de determinada doença. Por isso, dentre possibilidades para buscar pela função da variação genética poderiam primeiramente ser realizados testes a fim de identificar a associação encontrada no presente estudo em populações de diferentes etnias. Além disso, poderia ser realizado o sequenciamento do gene candidato, identificando também variantes raras que podem estar associadas à doença. Também podem ser verificadas variações que estejam em desequilíbrio de ligação com o *SNP* associado, buscando por suas localizações em regiões funcionais do próprio gene ou de algum gene próximo. Por fim, a realização de estudos funcionais utilizando técnicas de engenharia genética poderiam levar à uma melhor compreensão do efeito de determinada variante contra o desfecho de interesse.

8 CONCLUSÕES

1. Nossa estratégia de seleção de genes candidatos levou a identificação de 13 genes comuns a um mínimo de duas doenças autoimunes que ainda não haviam sido testados para o vitiligo;
2. Foram identificados sinais de associação entre os *SNPs* rs6545836 e rs2069763 dos genes *REL* e *IL2*, respectivamente. O alelo A de ambas as variações foi associada à proteção ao vitiligo *per se*;
3. Para ambos os marcadores associados ao vitiligo *per se* a evidência positiva de associação estava concentrada entre pacientes com comorbidade autoimune e forma clínica não segmentar;
4. Para os *SNPs* rs842647 e rs842648 do gene *REL* foram identificados sinais independentes de associação entre pacientes sem comorbidade autoimune e forma clínica segmentar. Já as variantes rs610604 e rs582757 do gene *TNFAIP3* e rs4833837 do gene *IL21* mostraram associação com significância estatística dentro do subgrupo de pacientes sem comorbidade autoimune;
5. A associação entre o marcador do gene *IL2* foi replicada na população de replicação do tipo caso-controle, porém com o alelo C sendo associado à proteção ao vitiligo;
6. A análise de impacto funcional da variante rs6545836 do gene *REL* sugeriu uma possível alteração de quatro motivos de DNA (*Hoxb6*, *Pou2f2*, *Pou5f1* e *Sox*), podendo também modificar os níveis de expressão do gene *AHSA2*;
7. Já o *SNP* rs2069763 do gene *IL2* está em DL com a variante rs45599938, localizada em uma região regulatória da *IL2*, em um sítio de ligação CTCF (*CCCTC-binding factor* – Fator de ligação-CCCTC), podendo também contribuir para o surgimento do vitiligo.

REFERÊNCIAS

1. Motulsky AG. Genetics of complex diseases. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2006;7(2):167-8. Epub 2006/01/20.
2. Tarle RG, Nascimento LM, Mira MT, Castro CC. Vitiligo--part 1. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2014;89(3):461-70. Epub 2014/06/18.
3. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994;265(5181):2037-48. Epub 1994/09/30.
4. Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan MA, Selmi C, et al. Twin studies in autoimmune disease: genetics, gender and environment. *Journal of autoimmunity*. 2012;38(2-3):J156-69. Epub 2011/12/20.
5. Feitosa MF, Krieger H. Future of genetic epidemiology in complex traits. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2002;7(1):73-83.
6. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet*. 2005;366(9491):1121-31. Epub 2005/09/27.
7. Cobat A, Abel L, Alcais A, Schurr E. A general efficient and flexible approach for genome-wide association analyses of imputed genotypes in family-based designs. *Genetic epidemiology*. 2014;38(6):560-71. Epub 2014/07/22.
8. Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(2):91-9. Epub 2001/03/17.
9. Mueller JC. Linkage disequilibrium for different scales and applications. *Briefings in bioinformatics*. 2004;5(4):355-64. Epub 2004/12/21.
10. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *American journal of human genetics*. 2004;74(1):106-20. Epub 2003/12/19.
11. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS computational biology*. 2012;8(12):e1002822. Epub 2013/01/10.
12. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annual review of medicine*. 2005;56:303-20. Epub 2005/01/22.
13. Welter D, MacArthur J, Morales J, Burdett T, Hall P, Junkins H, et al. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D1001-6. Epub 2013/12/10.
14. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(10):754-65. Epub 2012/03/06.
15. Kochi Y. Genetics of autoimmune diseases: perspectives from genome-wide association studies. *International immunology*. 2016;28(4):155-61. Epub 2016/02/10.
16. Moroni L, Bianchi I, Lleo A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(6-7):A386-92. Epub 2011/12/07.
17. Selmi C, Lu Q, Humble MC. Heritability versus the role of the environment in autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2012;39(4):249-52. Epub 2012/09/18.
18. Lessard CJ, Ice JA, Adrianto I, Wiley GB, Kelly JA, Gaffney PM, et al. The genomics of autoimmune disease in the era of genome-wide association studies and beyond. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(4):267-75. Epub 2011/10/18.

19. Invernizzi P, Gershwin ME. The genetics of human autoimmune disease. *Journal of autoimmunity*. 2009;33(3-4):290-9. Epub 2009/08/18.
20. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;65(3):473-91. Epub 2011/08/16.
21. Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T, Katayama I, Hamzavi I, Lan CC, et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment cell & melanoma research*. 2012;25(3):E1-13. Epub 2012/03/16.
22. Sandoval-Cruz M, Garcia-Carrasco M, Sanchez-Porrás R, Mendoza-Pinto C, Jimenez-Hernandez M, Munguia-Realpozo P, et al. Immunopathogenesis of vitiligo. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(12):762-5. Epub 2011/02/22.
23. Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Pigment Cell Research*. 2007;20(4):271-8.
24. Rodrigues M, Ezzedine K, Hamzavi I, Pandya AG, Harris JE. New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017;77(1):1-13. Epub 2017/06/18.
25. Sun X, Xu A, Wei X, Ouyang J, Lu L, Chen M, et al. Genetic epidemiology of vitiligo: a study of 815 probands and their families from south China. *International journal of dermatology*. 2006;45(10):1176-81. Epub 2006/10/17.
26. Kopera D. Historical aspects and definition of vitiligo. *Clinics in dermatology*. 1997;15(6):841-3. Epub 1997/12/24.
27. Millington GW, Levell NJ. Vitiligo: the historical curse of depigmentation. *International journal of dermatology*. 2007;46(9):990-5. Epub 2007/09/08.
28. Kruger C, Schallreuter KU. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. *International journal of dermatology*. 2012;51(10):1206-12. Epub 2012/03/31.
29. Kyriakis KP, Palamaras I, Tsele E, Michailides C, Terzoudi S. Case detection rates of vitiligo by gender and age. *International journal of dermatology*. 2009;48(3):328-9. Epub 2009/03/06.
30. Silva de Castro CC, Miot HA. Prevalence of vitiligo in Brazil - a population survey. *Pigment cell & melanoma research*. 2017. Epub 2017/12/23.
31. Sehgal VN, Srivastava G. Vitiligo: compendium of clinico-epidemiological features. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. 2007;73(3):149-56. Epub 2007/06/15.
32. Zhang Z, Xu SX, Zhang FY, Yin XY, Yang S, Xiao FL, et al. The analysis of genetics and associated autoimmune diseases in Chinese vitiligo patients. *Archives of dermatological research*. 2009;301(2):167-73. Epub 2008/10/08.
33. Alkhateeb A, Fain PR, Thody A, Bennett DC, Spritz RA. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2003;16(3):208-14. Epub 2003/05/20.
34. Taieb A, Picardo M. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment cell research / sponsored by the European*

- Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society. 2007;20(1):27-35. Epub 2007/01/26.
35. Taieb A, Picardo M. Clinical practice. Vitiligo. *The New England journal of medicine*. 2009;360(2):160-9. Epub 2009/01/09.
36. Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, van Geel N. Vitiligo. *Lancet*. 2015. Epub 2015/01/19.
37. Faria AR, Tarle RG, Dellatorre G, Mira MT, Castro CC. Vitiligo--Part 2--classification, histopathology and treatment. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2014;89(5):784-90. Epub 2014/09/04.
38. Taieb A, Alomar A, Böhm M, Dell'Anna ML, De Pase A, Eleftheriadou V, et al. Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum consensus. *British Journal of Dermatology*. 2013;168(1):5-19.
39. Machado do Nascimento L, Silva de Castro CC, Medeiros Fava V, Iani Werneck R, Tavora Mira M. Genetic and biochemical evidence implicates the butyrylcholinesterase gene BCHE in vitiligo pathogenesis. *Experimental dermatology*. 2015;24(12):976-8. Epub 2015/07/21.
40. Silva de Castro CC, do Nascimento LM, Walker G, Werneck RI, Nogoceke E, Mira MT. Genetic variants of the DDR1 gene are associated with vitiligo in two independent Brazilian population samples. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(7):1813-8. Epub 2010/02/26.
41. Tarle RG, Silva de Castro CC, do Nascimento LM, Mira MT. Polymorphism of the E-cadherin gene CDH1 is associated with susceptibility to vitiligo. *Experimental dermatology*. 2015;24(4):300-2. Epub 2015/01/24.
42. Gauthier Y, Cario-Andre M, Lepreux S, Pain C, Taieb A. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *The British journal of dermatology*. 2003;148(1):95-101. Epub 2003/01/22.
43. Kumar R, Parsad D, Kanwar AJ. Role of apoptosis and melanocytorrhagy: a comparative study of melanocyte adhesion in stable and unstable vitiligo. *The British journal of dermatology*. 2011;164(1):187-91. Epub 2010/12/24.
44. Malhotra N, Dytoc M. The pathogenesis of vitiligo. *Journal of cutaneous medicine and surgery*. 2013;17(3):153-72. Epub 2013/05/16.
45. Xie H, Zhou F, Liu L, Zhu G, Li Q, Li C, et al. Vitiligo: How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity? *Journal of dermatological science*. 2016;81(1):3-9. Epub 2015/09/22.
46. Mitra S, De Sarkar S, Pradhan A, Pati AK, Pradhan R, Mondal D, et al. Levels of oxidative damage and proinflammatory cytokines are enhanced in patients with active vitiligo. *Free radical research*. 2017;51(11-12):986-94. Epub 2017/11/29.
47. Khan R, Satyam A, Gupta S, Sharma VK, Sharma A. Circulatory levels of antioxidants and lipid peroxidation in Indian patients with generalized and localized vitiligo. *Archives of dermatological research*. 2009;301(10):731-7. Epub 2009/06/03.
48. Song P, Wang XW, Li HX, Li K, Liu L, Wei C, et al. Association between FOXP3 polymorphisms and vitiligo in a Han Chinese population. *The British journal of dermatology*. 2013;169(3):571-8. Epub 2013/04/16.
49. Zhou L, Li K, Shi YL, Hamzavi I, Gao TW, Henderson M, et al. Systemic analyses of immunophenotypes of peripheral T cells in non-segmental vitiligo: implication of

- defective natural killer T cells. *Pigment cell & melanoma research*. 2012;25(5):602-11. Epub 2012/05/18.
50. Eby JM, Kang HK, Tully ST, Bindeman WE, Peiffer DS, Chatterjee S, et al. CCL22 to Activate Treg Migration and Suppress Depigmentation in Vitiligo. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(6):1574-80. Epub 2015/01/31.
51. Ongenaes K, Van Geel N, Naeyaert JM. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2003;16(2):90-100. Epub 2003/03/08.
52. Laberge G, Mailloux CM, Gowan K, Holland P, Bennett DC, Fain PR, et al. Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 2005;18(4):300-5. Epub 2005/07/21.
53. Zhang XJ, Liu JB, Gui JP, Li M, Xiong QG, Wu HB, et al. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004;51(3):383-90. Epub 2004/09/01.
54. Birlea SA, Gowan K, Fain PR, Spritz RA. Genome-wide association study of generalized vitiligo in an isolated European founder population identifies SMO2, in close proximity to IDDM8. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(3):798-803. Epub 2009/11/06.
55. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Gowan K, Riccardi SL, Holland PJ, et al. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *The New England journal of medicine*. 2010;362(18):1686-97. Epub 2010/04/23.
56. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Ferrara TM, Ben S, Riccardi SL, et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nature genetics*. 2012;44(6):676-80. Epub 2012/05/09.
57. Jin Y, Andersen G, Yorgov D, Ferrara TM, Ben S, Brownson KM, et al. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. *Nature genetics*. 2016;48(11):1418-24. Epub 2016/10/28.
58. Ben S, Jin Y, Santorico SA, Spritz RA. Genome-Wide Association of PVT1 with Vitiligo. *The Journal of investigative dermatology*. 2018. Epub 2018/03/06.
59. Han JW, Zheng HF, Cui Y, Sun LD, Ye DQ, Hu Z, et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*. 2009;41(11):1234-7. Epub 2009/10/20.
60. Quan C, Ren YQ, Xiang LH, Sun LD, Xu AE, Gao XH, et al. Genome-wide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and the MHC. *Nature genetics*. 2010;42(7):614-U192.
61. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Gowan K, Riccardi SL, Holland PJ, et al. Genome-wide analysis identifies a quantitative trait locus in the MHC class II region associated with generalized vitiligo age of onset. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(6):1308-12. Epub 2011/02/18.
62. Cheong KA, Kim NH, Noh M, Lee AY. Three new single nucleotide polymorphisms identified by a genome-wide association study in Korean patients with vitiligo. *Journal of Korean medical science*. 2013;28(5):775-9. Epub 2013/05/17.

63. John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic acids research*. 1991;19(2):408. Epub 1991/01/25.
64. Frigeri HR. Variabilidade Genética e Sequenciamento de Genes associados ao Diabetes mellitus tipo 2 e à Obesidade: Universidade Federal do Paraná; 2015.
65. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. *European journal of human genetics : EJHG*. 2001;9(4):301-6. Epub 2001/04/21.
66. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D877-81. Epub 2015/12/15.
67. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen JE, et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nature genetics*. 2008;40(12):1399-401. Epub 2008/11/04.
68. Grant SF, Qu HQ, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, et al. Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. *Diabetes*. 2009;58(1):290-5. Epub 2008/10/09.
69. Kiani AK, John P, Bhatti A, Zia A, Shahid G, Akhtar P, et al. Association of 32 type 1 diabetes risk loci in Pakistani patients. *Diabetes research and clinical practice*. 2015;108(1):137-42. Epub 2015/02/11.
70. Kiani AK, Jahangir S, John P, Bhatti A, Zia A, Wang X, et al. Genetic link of type 1 diabetes susceptibility loci with rheumatoid arthritis in Pakistani patients. *Immunogenetics*. 2015;67(5-6):277-82. Epub 2015/04/24.
71. Liu W, Wang HN, Gu ZH, Yang SY, Ye XP, Pan CM, et al. Identification of BACH2 as a susceptibility gene for Graves' disease in the Chinese Han population based on a three-stage genome-wide association study. *Human genetics*. 2014;133(5):661-71. Epub 2013/12/19.
72. Deshmukh HA, Maiti AK, Kim-Howard XR, Rojas-Villarraga A, Guthridge JM, Anaya JM, et al. Evaluation of 19 autoimmune disease-associated loci with rheumatoid arthritis in a Colombian population: evidence for replication and gene-gene interaction. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(9):1866-70. Epub 2011/07/19.
73. Orozco G, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Morgan AW, Wilson AG, et al. Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(3):463-8. Epub 2010/11/12.
74. Demirci FY, Wang X, Kelly JA, Morris DL, Barmada MM, Feingold E, et al. Identification of a New Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus on Chromosome 12 in Individuals of European Ancestry. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(1):174-83. Epub 2015/09/01.
75. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *The New England journal of medicine*. 2008;358(9):900-9. Epub 2008/01/22.
76. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, et al. Replication of the association between the C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(2):553-8. Epub 2009/01/31.
77. Jarvinen TM, Hellquist A, Zucchelli M, Koskenmies S, Panelius J, Hasan T, et al. Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes

- affirms B-cell receptor pathway signalling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(1):87-92. Epub 2011/11/01.
78. Lessard CJ, Sajuthi S, Zhao J, Kim K, Ice JA, Li H, et al. Identification of a Systemic Lupus Erythematosus Risk Locus Spanning ATG16L2, FCHSD2, and P2RY2 in Koreans. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(5):1197-209. Epub 2015/12/15.
79. Pamuk ON, Gurkan H, Pamuk GE, Tozkir H, Duymaz J, Yazar M. BLK pathway-associated rs13277113 GA genotype is more frequent in SLE patients and associated with low gene expression and increased flares. *Clinical rheumatology*. 2017;36(1):103-9. Epub 2016/11/20.
80. Sanchez E, Comeau ME, Freedman BI, Kelly JA, Kaufman KM, Langefeld CD, et al. Identification of novel genetic susceptibility loci in African American lupus patients in a candidate gene association study. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(11):3493-501. Epub 2011/07/28.
81. Suarez-Gestal M, Calaza M, Endreffy E, Pullmann R, Ordi-Ros J, Sebastiani GD, et al. Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case-control study. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):R69. Epub 2009/05/16.
82. Yang W, Ng P, Zhao M, Hirankarn N, Lau CS, Mok CC, et al. Population differences in SLE susceptibility genes: STAT4 and BLK, but not PXX, are associated with systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese. *Genes and immunity*. 2009;10(3):219-26. Epub 2009/02/20.
83. Yang W, Shen N, Ye DQ, Liu Q, Zhang Y, Qian XX, et al. Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS genetics*. 2010;6(2):e1000841. Epub 2010/02/20.
84. Zhang Z, Zhu KJ, Xu Q, Zhang XJ, Sun LD, Zheng HF, et al. The association of the BLK gene with SLE was replicated in Chinese Han. *Archives of dermatological research*. 2010;302(8):619-24. Epub 2010/02/05.
85. Frederiksen BN, Steck AK, Kroehl M, Lamb MM, Wong R, Rewers M, et al. Evidence of stage- and age-related heterogeneity of non-HLA SNPs and risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the diabetes autoimmunity study in the young. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:417657. Epub 2013/12/25.
86. Zhang XH, Shen M, Liu L, Li FM, Hu PC, Hua Q, et al. Association Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in C1QTNF6, RAC2, and an Intergenic Region at 14q32.2 with Graves' Disease in Chinese Han Population. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2017;21(8):479-84. Epub 2017/07/01.
87. Zhao SX, Xue LQ, Liu W, Gu ZH, Pan CM, Yang SY, et al. Robust evidence for five new Graves' disease risk loci from a staged genome-wide association analysis. *Human molecular genetics*. 2013;22(16):3347-62. Epub 2013/04/25.
88. Martinez A, Perdignes N, Cenit MC, Espino L, Varade J, Lamas JR, et al. Chromosomal region 16p13: further evidence of increased predisposition to immune diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(1):309-11. Epub 2009/02/18.
89. Skinningsrud B, Lie BA, Husebye ES, Kvien TK, Forre O, Flato B, et al. A CLEC16A variant confers risk for juvenile idiopathic arthritis and anti-cyclic citrullinated

- peptide antibody negative rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(8):1471-4. Epub 2009/09/08.
90. Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*. 2009;41(11):1228-33. Epub 2009/10/20.
91. Muhali FS, Cai TT, Zhu JL, Qin Q, Xu J, He ST, et al. Polymorphisms of CLEC16A region and autoimmune thyroid diseases. *G3 (Bethesda)*. 2014;4(6):973-7. Epub 2014/03/22.
92. Jagielska D, Redler S, Brockschmidt FF, Herold C, Pasternack SM, Garcia Bartels N, et al. Follow-up study of the first genome-wide association scan in alopecia areata: IL13 and KIAA0350 as susceptibility loci supported with genome-wide significance. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(9):2192-7. Epub 2012/04/27.
93. Benmansour J, Stayoussef M, Al-Jenaidi FA, Rajab MH, Rayana CB, Said HB, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to autoimmune type 1 diabetes in Tunisians. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17(9):1473-7. Epub 2010/07/09.
94. Ei Wafai RJ, Chmaisse HN, Makki RF, Fakhoury H. Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*. 2011;22(2):273-81. Epub 2011/03/23.
95. Haller K, Kisand K, Nemvalts V, Laine AP, Ilonen J, Uibo R. Type 1 diabetes is insulin -2221 MspI and CTLA-4 +49 A/G polymorphism dependent. *European journal of clinical investigation*. 2004;34(8):543-8. Epub 2004/08/13.
96. Jin P, Xiang B, Huang G, Zhou Z. The association of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 + 49A/G and CT60 polymorphisms with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in Chinese adults. *Journal of endocrinological investigation*. 2015;38(2):149-54. Epub 2014/09/05.
97. Lee YJ, Huang FY, Lo FS, Wang WC, Hsu CH, Kao HA, et al. Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clinical endocrinology*. 2000;52(2):153-7. Epub 2000/02/15.
98. Liang H, Yagi K, Asano A, Kobayashi J, Mabuchi H. Association between CTLA-4 +49 A/G polymorphism and type 1B diabetes in Japanese population. *Endocrine*. 2004;25(2):105-9. Epub 2005/02/16.
99. Takara M, Komiya I, Kinjo Y, Tomoyose T, Yamashiro S, Akamine H, et al. Association of CTLA-4 gene A/G polymorphism in Japanese type 1 diabetic patients with younger age of onset and autoimmune thyroid disease. *Diabetes care*. 2000;23(7):975-8. Epub 2000/07/15.
100. Zalloua PA, Abchee A, Shbaklo H, Zreik TG, Terwedow H, Halaby G, et al. Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene. *Hum Immunol*. 2004;65(7):719-24. Epub 2004/08/11.
101. Daha NA, Kurreeman FA, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Verduijn W, Huizinga TW, et al. Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(5):1255-60. Epub 2009/05/01.

102. Danoy P, Wei M, Johanna H, Jiang L, He D, Sun L, et al. Association of variants in MMEL1 and CTLA4 with rheumatoid arthritis in the Han Chinese population. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(10):1793-7. Epub 2011/07/26.
103. Fattah SA, Ghattas MH, Saleh SM, Abo-Elmatty DM. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 gene polymorphism is related to rheumatoid arthritis in Egyptian population. *Archives of physiology and biochemistry*. 2017;123(1):50-3. Epub 2016/11/04.
104. Gonzalez-Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela A, Garcia A, Garcia-Lozano JR, Nunez-Roldan A. CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue antigens*. 1999;53(3):296-300. Epub 1999/04/15.
105. Lee CS, Lee YJ, Liu HF, Su CH, Chang SC, Wang BR, et al. Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with rheumatoid arthritis in Chinese. *Clinical rheumatology*. 2003;22(3):221-4. Epub 2003/09/25.
106. Lei C, Dongqing Z, Yeqing S, Oaks MK, Lishan C, Jianzhong J, et al. Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *European journal of human genetics : EJHG*. 2005;13(7):823-8. Epub 2005/04/21.
107. Munoz-Valle JF, Valle Y, Padilla-Gutierrez JR, Parra-Rojas I, Rangel-Villalobos H, Vazquez del Mercado M, et al. The +49A>G CTLA-4 polymorphism is associated with rheumatoid arthritis in Mexican population. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411(9-10):725-8. Epub 2010/02/09.
108. Rodriguez MR, Nunez-Roldan A, Aguilar F, Valenzuela A, Garcia A, Gonzalez-Escribano MF. Association of the CTLA4 3' untranslated region polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2002;63(1):76-81. Epub 2002/03/28.
109. Walker EJ, Hirschfield GM, Xu C, Lu Y, Liu X, Coltescu C, et al. CTLA4/ICOS gene variants and haplotypes are associated with rheumatoid arthritis and primary biliary cirrhosis in the Canadian population. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(4):931-7. Epub 2009/04/01.
110. Yanagawa T, Gomi K, Nakao EI, Inada S. CTLA-4 gene polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(12):2740-2. Epub 2000/12/29.
111. Budarf ML, Goyette P, Boucher G, Lian J, Graham RR, Claudio JO, et al. A targeted association study in systemic lupus erythematosus identifies multiple susceptibility alleles. *Genes and immunity*. 2011;12(1):51-8. Epub 2010/10/22.
112. Devaraju P, Gulati R, Singh BK, Mithun CB, Negi VS. The CTLA4 +49 A/G (rs231775) polymorphism influences susceptibility to SLE in South Indian Tamils. *Tissue antigens*. 2014;83(6):418-21. Epub 2014/04/25.
113. Hudson LL, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Human genetics*. 2002;111(4-5):452-5. Epub 2002/10/18.
114. Katkam SK, Kumaraswami K, Rupasree Y, Thishya K, Rajasekhar L, Kutala VK. Association of CTLA4 exon-1 polymorphism with the tumor necrosis factor-alpha in the risk of systemic lupus erythematosus among South Indians. *Hum Immunol*. 2016;77(2):158-64. Epub 2015/11/20.
115. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Genome-wide pathway analysis of genome-wide association studies on systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Molecular biology reports*. 2012;39(12):10627-35. Epub 2012/10/12.

116. Torres B, Aguilar F, Franco E, Sanchez E, Sanchez-Roman J, Jimenez Alonso J, et al. Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(7):2211-5. Epub 2004/07/13.
117. Ulker M, Yazisiz V, Sallakci N, Avci AB, Sanlioglu S, Yegin O, et al. CTLA-4 gene polymorphism of exon 1(+49 A/G) in Turkish systemic lupus erythematosus patients. *International journal of immunogenetics*. 2009;36(4):245-50. Epub 2009/07/16.
118. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M. Association of a CTLA-4 3' untranslated region (CT60) single nucleotide polymorphism with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *Autoimmunity*. 2005;38(2):151-3. Epub 2005/07/26.
119. Chen PL, Fann CS, Chang CC, Wu IL, Chiu WY, Lin CY, et al. Family-based association study of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 with susceptibility to Graves' disease in Han population of Taiwan. *Genes and immunity*. 2008;9(2):87-92. Epub 2007/12/07.
120. Esteghamati A, Khalilzadeh O, Mobarra Z, Anvari M, Tahvildari M, Amiri HM, et al. Association of CTLA-4 gene polymorphism with Graves' disease and ophthalmopathy in Iranian patients. *European journal of internal medicine*. 2009;20(4):424-8. Epub 2009/06/16.
121. Fang W, Zhang Z, Zhang J, Cai Z, Zeng H, Chen M, et al. Association of the CTLA4 gene CT60/rs3087243 single-nucleotide polymorphisms with Graves' disease. *Biomedical reports*. 2015;3(5):691-6. Epub 2015/09/26.
122. Gu LQ, Zhu W, Zhao SX, Zhao L, Zhang MJ, Cui B, et al. Clinical associations of the genetic variants of CTLA-4, Tg, TSHR, PTPN22, PTPN12 and FCRL3 in patients with Graves' disease. *Clinical endocrinology*. 2010;72(2):248-55. Epub 2009/05/15.
123. Sahin M, Gursoy A, Erdogan MF. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 polymorphism in Turkish patients with Hashimoto thyroiditis. *International journal of immunogenetics*. 2009;36(2):103-6. Epub 2009/03/17.
124. Ting WH, Chien MN, Lo FS, Wang CH, Huang CY, Lin CL, et al. Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study. *PloS one*. 2016;11(4):e0154394. Epub 2016/04/26.
125. Tsai ST, Huang CY, Lo FS, Chang YT, Tanizawa T, Chen CK, et al. Association of CT60 polymorphism of the CTLA4 gene with Graves' disease in Taiwanese children. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2008;21(7):665-72. Epub 2008/09/11.
126. Yang J, Qin Q, Yan N, Zhu YF, Li C, Yang XJ, et al. CD40 C/T(-1) and CTLA-4 A/G(49) SNPs are associated with autoimmune thyroid diseases in the Chinese population. *Endocrine*. 2012;41(1):111-5. Epub 2011/08/26.
127. Yesilkaya E, Koc A, Bideci A, Camurdan O, Boyraz M, Erkal O, et al. CTLA4 gene polymorphisms in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases. *Genetic testing*. 2008;12(3):461-4. Epub 2008/08/30.
128. Wolff AS, Mitchell AL, Cordell HJ, Short A, Skinningsrud B, Ollier W, et al. CTLA-4 as a genetic determinant in autoimmune Addison's disease. *Genes and immunity*. 2015;16(6):430-6. Epub 2015/07/24.
129. Blomhoff A, Lie BA, Myhre AG, Kemp EH, Weetman AP, Akselsen HE, et al. Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility

- to Addison's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(7):3474-6. Epub 2004/07/09.
130. John KK, Brockschmidt FF, Redler S, Herold C, Hanneken S, Eigelshoven S, et al. Genetic variants in CTLA4 are strongly associated with alopecia areata. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(5):1169-72. Epub 2011/02/25.
131. Petukhova L, Duvic M, Hordinsky M, Norris D, Price V, Shimomura Y, et al. Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. *Nature*. 2010;466(7302):113-7. Epub 2010/07/03.
132. Shin MK, Im SH, Park HJ, Kim SK, Yim SV, Chung JH, et al. Association study between polymorphisms of CD28, CTLA4 and ICOS and non-segmental vitiligo in a Korean population. *Experimental and therapeutic medicine*. 2011;2(6):1145-9. Epub 2012/09/15.
133. Birlea SA, Jin Y, Bennett DC, Herbstman DM, Wallace MR, McCormack WT, et al. Comprehensive association analysis of candidate genes for generalized vitiligo supports XBP1, FOXP3, and TSLP. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(2):371-81. Epub 2010/11/19.
134. Pehlivan S, Ozkinay F, Alper S, Onay H, Yuksel E, Pehlivan M, et al. Association between IL4 (-590), ACE (I)/(D), CCR5 (Delta32), CTLA4 (+49) and IL1-RN (VNTR in intron 2) gene polymorphisms and vitiligo. *European journal of dermatology : EJD*. 2009;19(2):126-8. Epub 2009/01/09.
135. Dwivedi M, Laddha NC, Imran M, Shah BJ, Begum R. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) in isolated vitiligo: a genotype-phenotype correlation. *Pigment cell & melanoma research*. 2011;24(4):737-40. Epub 2011/07/29.
136. Itirli G, Pehlivan M, Alper S, Yuksel SE, Onay H, Ozkinay F, et al. Exon-3 polymorphism of CTLA-4 gene in Turkish patients with vitiligo. *Journal of dermatological science*. 2005;38(3):225-7. Epub 2005/05/13.
137. Bailey R, Cooper JD, Zeitels L, Smyth DJ, Yang JH, Walker NM, et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(10):2616-21. Epub 2007/07/04.
138. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H, Burren OS, Wallace C, et al. Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(5):1624-31. Epub 2011/03/29.
139. Hussein AG, Mohamed RH, Alghobashy AA. Synergism of CYP2R1 and CYP27B1 polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Egyptian children. *Cellular immunology*. 2012;279(1):42-5. Epub 2012/10/16.
140. Lopez ER, Regulla K, Pani MA, Krause M, Usadel KH, Badenhop K. CYP27B1 polymorphisms variants are associated with type 1 diabetes mellitus in Germans. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2004;89-90(1-5):155-7. Epub 2004/07/01.
141. Lopez ER, Zwermann O, Segni M, Meyer G, Reincke M, Seissler J, et al. A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2004;151(2):193-7. Epub 2004/08/07.

142. Kurylowicz A, Badenhoop K. CYP27B1 gene polymorphism is associated with Graves' disease in a Polish population study. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2005;15(9):1107-8. Epub 2005/09/29.
143. Yang J, Xiong F. [Relevance of CYP27B1 gene promoter polymorphism to autoimmune thyroid diseases]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2008;28(4):606-8. Epub 2008/05/23.
144. Fichna M, Zurawek M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Gryczynska M, Fichna P, Sowinski J, et al. Association of the CYP27B1 C(-1260)A polymorphism with autoimmune Addison's disease. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2010;118(8):544-9. Epub 2009/12/10.
145. Jennings CE, Owen CJ, Wilson V, Pearce SH. A haplotype of the CYP27B1 promoter is associated with autoimmune Addison's disease but not with Graves' disease in a UK population. *Journal of molecular endocrinology*. 2005;34(3):859-63. Epub 2005/06/16.
146. Sahin SB, Cetinkalp S, Erdogan M, Yilmaz C, Berdeli A. Fas, Fas Ligand, and vitamin D Receptor FokI gene polymorphisms in patients with type 1 diabetes mellitus in the Aegean region of Turkey. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2012;16(10):1179-83. Epub 2012/09/06.
147. Yildir S, Sezgin M, Barlas IO, Turkoz G, Ankarali HC, Sahin G, et al. Relation of the Fas and FasL gene polymorphisms with susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2013;33(10):2637-45. Epub 2013/06/12.
148. Chen JY, Wang CM, Lu SC, Chou YH, Luo SF. Association of apoptosis-related microsatellite polymorphisms on chromosome 1q in Taiwanese systemic lupus erythematosus patients. *Clinical and experimental immunology*. 2006;143(2):281-7. Epub 2006/01/18.
149. Chen JY, Wang CM, Ma CC, Chow YH, Luo SF. The -844C/T polymorphism in the Fas ligand promoter associates with Taiwanese SLE. *Genes and immunity*. 2005;6(2):123-8. Epub 2005/01/28.
150. Moudi B, Salimi S, Farajian Mashhadi F, Sandoughi M, Zakeri Z. Association of FAS and FAS ligand genes polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:176741. Epub 2013/12/19.
151. Li M, Sun D, Li C, Zhang Z, Gao L, Li K, et al. Functional polymorphisms of the FAS gene associated with risk of vitiligo in Chinese populations: a case-control analysis. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(12):2820-4. Epub 2008/06/13.
152. Paradowska-Gorycka A, Jurkowska M, Felis-Giemza A, Romanowska-Prochnicka K, Manczak M, Maslinski S, et al. Genetic polymorphisms of Foxp3 in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2015;42(2):170-80. Epub 2014/12/03.
153. Lan Y, Tang XS, Qin J, Wu J, Qin JM. [Association of transcription factor FOXP3 gene polymorphism with genetic susceptibility to systematic lupus erythematosus in Guangxi Zhuang population]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*. 2010;27(4):433-6. Epub 2010/08/03.
154. Lin YC, Lee JH, Wu AS, Tsai CY, Yu HH, Wang LC, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in FOXP3 gene with systemic lupus erythematosus susceptibility: a case-control study. *Lupus*. 2011;20(2):137-43. Epub 2010/11/17.

155. Gao L, Li K, Li F, Li H, Liu L, Wang L, et al. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *Journal of dermatological science*. 2010;57(1):51-6. Epub 2009/11/03.
156. Song QH, Shen Z, Xing XJ, Yin R, Wu YZ, You Y, et al. An association study of single nucleotide polymorphisms of the FOXP3 intron-1 and the risk of Psoriasis vulgaris. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 2012;49(1):25-35. Epub 2012/03/23.
157. Bossowski A, Borysewicz-Sanczyk H, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Zasim A, Szalecki M, Wikiera B, et al. Analysis of chosen polymorphisms in FoxP3 gene in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2014;47(6):395-400. Epub 2014/05/03.
158. Zheng L, Wang X, Xu L, Wang N, Cai P, Liang T, et al. Foxp3 gene polymorphisms and haplotypes associate with susceptibility of Graves' disease in Chinese Han population. *International immunopharmacology*. 2015;25(2):425-31. Epub 2015/02/25.
159. Conteduca G, Rossi A, Megiorni F, Parodi A, Ferrera F, Tardito S, et al. Single nucleotide polymorphisms in the promoter regions of Foxp3 and ICOSLG genes are associated with Alopecia areata. *Clinical and experimental medicine*. 2014;14(1):91-7. Epub 2012/12/01.
160. Jahan P, Cheruvu R, Tippisetty S, Komaravalli PL, Valluri V, Ishaq M. Association of FOXP3 (rs3761548) promoter polymorphism with nondermatomal vitiligo: A study from India. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013;69(2):262-6. Epub 2013/03/19.
161. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science*. 2009;324(5925):387-9. Epub 2009/03/07.
162. Rodriguez A, Alfaro JM, Balthazar V, Pineda Trujillo N. Association analysis of PTPN22, CTLA4 and IFIH1 genes with type 1 diabetes in Colombian families. *Journal of diabetes*. 2015;7(3):402-10. Epub 2014/07/22.
163. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nature genetics*. 2006;38(6):617-9. Epub 2006/05/16.
164. Yang H, Wang Z, Xu K, Gu R, Chen H, Yu D, et al. IFIH1 gene polymorphisms in type 1 diabetes: genetic association analysis and genotype-phenotype correlation in Chinese Han population. *Autoimmunity*. 2012;45(3):226-32. Epub 2011/11/08.
165. Cen H, Leng RX, Wang W, Zhou M, Feng CC, Zhu Y, et al. Association study of IFIH1 rs1990760 polymorphism with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Inflammation*. 2013;36(2):444-8. Epub 2012/10/31.
166. Cunninghame Graham DS, Morris DL, Bhangale TR, Criswell LA, Syvanen AC, Ronnblom L, et al. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. *PLoS genetics*. 2011;7(10):e1002341. Epub 2011/11/03.
167. Li Y, Liao W, Cargill M, Chang M, Matsunami N, Feng BJ, et al. Carriers of rare missense variants in IFIH1 are protected from psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(12):2768-72. Epub 2010/07/30.

168. Sheng Y, Jin X, Xu J, Gao J, Du X, Duan D, et al. Sequencing-based approach identified three new susceptibility loci for psoriasis. *Nature communications*. 2014;5:4331. Epub 2014/07/10.
169. Strange A, Capon F, Spencer CC, Knight J, Weale ME, Allen MH, et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature genetics*. 2010;42(11):985-90. Epub 2010/10/19.
170. Urcelay E, Santiago JL, de la Calle H, Martinez A, Figueredo A, Fernandez-Arquero M, et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish type 1 diabetes patients. *Genes and immunity*. 2004;5(4):306-9. Epub 2004/04/02.
171. Abanmi A, Al Harthi F, Zouman A, Kudwah A, Jamal MA, Arfin M, et al. Association of Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Saudi patients with vitiligo. *Disease markers*. 2008;24(1):51-7. Epub 2007/12/07.
172. Aydingoz IE, Kanmaz-Ozer M, Gedikbasi A, Vural P, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M. The combination of tumour necrosis factor-alpha -308A and interleukin-10 -1082G gene polymorphisms and increased serum levels of related cytokines: susceptibility to vitiligo. *Clinical and experimental dermatology*. 2015;40(1):71-7. Epub 2014/10/07.
173. Liu Y, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, Gardner J, et al. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS genetics*. 2008;4(3):e1000041. Epub 2008/03/29.
174. Paradowska-Gorycka A, Sowinska A, Stypinska B, Haladyj E, Pawlik A, Romanowska-Prochnicka K, et al. IL-12B Gene Polymorphisms and IL-12 p70 Serum Levels Among Patients with Rheumatoid Arthritis. *Scandinavian journal of immunology*. 2017;85(2):147-54. Epub 2016/11/30.
175. Wang EY, Yang Q, Liao ZG. Association of polymorphisms in interleukin (IL)-12A and -B genes with rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Clinical and experimental immunology*. 2015;180(1):83-9. Epub 2014/12/04.
176. Miteva LD, Manolova IM, Ivanova MG, Rashkov RK, Stoilov RM, Gulubova MV, et al. Functional genetic polymorphisms in interleukin-12B gene in association with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*. 2012;32(1):53-9. Epub 2010/07/27.
177. Sun C, Molineros JE, Looger LL, Zhou XJ, Kim K, Okada Y, et al. High-density genotyping of immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry. *Nature genetics*. 2016;48(3):323-30. Epub 2016/01/26.
178. Yu B, Shao Y, Yue X, Zhang J, Guan M, Wan J, et al. Copy number variations of Interleukin-12B and T-bet are associated with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(7):1201-5. Epub 2011/02/01.
179. Boca AN, Talamonti M, Galluzzo M, Botti E, Vesa SC, Chimenti S, et al. Genetic variations in IL6 and IL12B decreasing the risk for psoriasis. *Immunology letters*. 2013;156(1-2):127-31. Epub 2013/10/22.
180. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, Baumber L, et al. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Human genetics*. 2007;122(2):201-6. Epub 2007/06/26.

181. Das S, Stuart PE, Ding J, Tejasvi T, Li Y, Tsoi LC, et al. Fine mapping of eight psoriasis susceptibility loci. *European journal of human genetics* : EJHG. 2015;23(6):844-53. Epub 2014/09/04.
182. Eiris N, Santos-Juanes J, Coto-Segura P, Gomez J, Alvarez V, Morales B, et al. Resequencing of the IL12B gene in psoriasis patients with the rs6887695/rs3212227 risk genotypes. *Cytokine*. 2012;60(1):27-9. Epub 2012/06/29.
183. Ellinghaus D, Ellinghaus E, Nair RP, Stuart PE, Esko T, Metspalu A, et al. Combined analysis of genome-wide association studies for Crohn disease and psoriasis identifies seven shared susceptibility loci. *American journal of human genetics*. 2012;90(4):636-47. Epub 2012/04/10.
184. Jadon D, Tillett W, Wallis D, Cavill C, Bowes J, Waldron N, et al. Exploring ankylosing spondylitis-associated ERAP1, IL23R and IL12B gene polymorphisms in subphenotypes of psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(2):261-6. Epub 2012/10/25.
185. Munir S, ber Rahman S, Rehman S, Saba N, Ahmad W, Nilsson S, et al. Association analysis of GWAS and candidate gene loci in a Pakistani population with psoriasis. *Molecular immunology*. 2015;64(1):190-4. Epub 2014/12/08.
186. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nature genetics*. 2009;41(2):199-204. Epub 2009/01/27.
187. Oka A, Mabuchi T, Ikeda S, Terui T, Haida Y, Ozawa A, et al. IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis. *Immunogenetics*. 2013;65(11):823-8. Epub 2013/08/21.
188. Yang Q, Liu H, Qu L, Fu X, Yu Y, Yu G, et al. Investigation of 20 non-HLA (human leucocyte antigen) psoriasis susceptibility loci in Chinese patients with psoriatic arthritis and psoriasis vulgaris. *The British journal of dermatology*. 2013;168(5):1060-5. Epub 2012/12/21.
189. Zhang XJ, Huang W, Yang S, Sun LD, Zhang FY, Zhu QX, et al. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nature genetics*. 2009;41(2):205-10. Epub 2009/01/27.
190. Zhang Z, Yuan J, Tian Z, Xu J, Lu Z. Investigation of 36 non-HLA (human leucocyte antigen) psoriasis susceptibility loci in a psoriatic arthritis cohort. *Archives of dermatological research*. 2017;309(2):71-7. Epub 2016/12/19.
191. Zuo X, Sun L, Yin X, Gao J, Sheng Y, Xu J, et al. Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis. *Nature communications*. 2015;6:6793. Epub 2015/04/10.
192. Zouidi F, Stayoussef M, Bouzid D, Fourati H, Abida O, Joao C, et al. Association of BANK1 and cytokine gene polymorphisms with type 1 diabetes in Tunisia. *Gene*. 2014;536(2):296-301. Epub 2013/12/18.
193. Trajkov D, Mishevaska-Perchinkova S, Karadzova-Stojanoska A, Petlichkovski A, Strezova A, Spiroski M. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. *Clinical rheumatology*. 2009;28(11):1291-300. Epub 2009/08/08.
194. Hughes T, Kim-Howard X, Kelly JA, Kaufman KM, Langefeld CD, Ziegler J, et al. Fine-mapping and transethnic genotyping establish IL2/IL21 genetic association with

- lupus and localize this genetic effect to IL21. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(6):1689-97. Epub 2011/03/23.
195. Lin YJ, Wan L, Sheu JJ, Huang CM, Lin CW, Lan YC, et al. A/C polymorphism in the interleukin-18 coding region among Taiwanese systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2008;17(2):124-7. Epub 2008/02/06.
196. Warren RB, Smith RL, Flynn E, Bowes J, Eyre S, Worthington J, et al. A systematic investigation of confirmed autoimmune loci in early-onset psoriasis reveals an association with IL2/IL21. *The British journal of dermatology*. 2011;164(3):660-4. Epub 2011/03/08.
197. Fichna M, Zurawek M, Bratland E, Husebye ES, Kasperlik-Zaluska A, Czarnocka B, et al. Interleukin-2 and subunit alpha of its soluble receptor in autoimmune Addison's disease--an association study and expression analysis. *Autoimmunity*. 2015;48(2):100-7. Epub 2014/10/28.
198. Lan Y, Luo B, Wang JL, Jiang YW, Wei YS. The association of interleukin-21 polymorphisms with interleukin-21 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus. *Gene*. 2014;538(1):94-8. Epub 2014/01/18.
199. Leng RX, Wang W, Cen H, Zhou M, Feng CC, Zhu Y, et al. Gene-gene and gene-sex epistatic interactions of MiR146a, IRF5, IKZF1, ETS1 and IL21 in systemic lupus erythematosus. *PloS one*. 2012;7(12):e51090. Epub 2012/12/14.
200. Sawalha AH, Kaufman KM, Kelly JA, Adler AJ, Aberle T, Kilpatrick J, et al. Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(4):458-61. Epub 2007/08/28.
201. Zhang J, Xiao WX, Zhu YF, Muhali FS, Xiao L, Jiang WJ, et al. Polymorphisms of interleukin-21 and interleukin-21-receptor genes confer risk for autoimmune thyroid diseases. *BMC endocrine disorders*. 2013;13:26. Epub 2013/07/31.
202. Mitchell AL, Macarthur KD, Gan EH, Baggott LE, Wolff AS, Skinningsrud B, et al. Association of autoimmune Addison's disease with alleles of STAT4 and GATA3 in European cohorts. *PloS one*. 2014;9(3):e88991. Epub 2014/03/13.
203. Costa VS, Santos AS, Fukui RT, Mattana TC, Matioli SR, Silva ME. Protective effect of interleukin-23A (IL23A) haplotype variants on type 1A diabetes mellitus in a Brazilian population. *Cytokine*. 2013;62(2):327-33. Epub 2013/04/13.
204. Eiris N, Gonzalez-Lara L, Santos-Juanes J, Queiro R, Coto E, Coto-Segura P. Genetic variation at IL12B, IL23R and IL23A is associated with psoriasis severity, psoriatic arthritis and type 2 diabetes mellitus. *Journal of dermatological science*. 2014;75(3):167-72. Epub 2014/06/25.
205. Jia H, Tao F, Liu C, Guo T, Zhu W, Wang S, et al. Both interleukin-23A polymorphism and serum interleukin-23 expression are associated with Graves' disease risk. *Cellular immunology*. 2015;294(1):39-43. Epub 2015/02/12.
206. Abdelrahman HM, Sherief LM, Abd Elrahman DM, Alghobashy A, Elsaadani HF, Mohamed RH. The association of PTPN22 (rs2476601) and IL2RA (rs11594656) polymorphisms with T1D in Egyptian children. *Hum Immunol*. 2016;77(8):682-6. Epub 2016/06/12.
207. Fichna M, Zurawek M, Fichna P, Januszkiewicz D, Nowak J. Polymorphic variants of the IL2RA gene and susceptibility to type 1 diabetes in the Polish population. *Tissue antigens*. 2012;79(3):198-203. Epub 2012/01/04.

208. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JH, et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *The New England journal of medicine*. 2008;359(26):2767-77. Epub 2008/12/17.
209. Tang W, Cui D, Jiang L, Zhao L, Qian W, Long SA, et al. Association of common polymorphisms in the IL2RA gene with type 1 diabetes: evidence of 32,646 individuals from 10 independent studies. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(10):2481-8. Epub 2015/08/08.
210. Diogo D, Kurreeman F, Stahl EA, Liao KP, Gupta N, Greenberg JD, et al. Rare, low-frequency, and common variants in the protein-coding sequence of biological candidate genes from GWASs contribute to risk of rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*. 2013;92(1):15-27. Epub 2012/12/25.
211. Prasad P, Kumar A, Gupta R, Juyal RC, Thelma BK. Caucasian and Asian specific rheumatoid arthritis risk loci reveal limited replication and apparent allelic heterogeneity in north Indians. *PloS one*. 2012;7(2):e31584. Epub 2012/02/23.
212. Ruiz-Larranaga O, Uribarri M, Alcaro MC, Escorza-Trevino S, Del Amo J, Iriando M, et al. Genetic variants associated with rheumatoid arthritis patients and serotypes in European populations. *Clinical and experimental rheumatology*. 2016;34(2):236-41. Epub 2016/03/05.
213. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics*. 2010;42(6):508-14. Epub 2010/05/11.
214. Carr EJ, Clatworthy MR, Lowe CE, Todd JA, Wong A, Vyse TJ, et al. Contrasting genetic association of IL2RA with SLE and ANCA-associated vasculitis. *BMC medical genetics*. 2009;10:22. Epub 2009/03/07.
215. Redler S, Albert F, Brockschmidt FF, Herold C, Hanneken S, Eigelshoven S, et al. Investigation of selected cytokine genes suggests that IL2RA and the TNF/LTA locus are risk factors for severe alopecia areata. *The British journal of dermatology*. 2012;167(6):1360-5. Epub 2012/08/18.
216. Settin A, Ismail A, El-Magd MA, El-Baz R, Kazamel A. Gene polymorphisms of TNF-alpha-308 (G/A), IL-10(-1082) (G/A), IL-6(-174) (G/C) and IL-1Ra (VNTR) in Egyptian cases with type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*. 2009;42(1):50-5. Epub 2009/01/08.
217. Marinou I, Walters K, Winfield J, Bax DE, Wilson AG. A gain of function polymorphism in the interleukin 6 receptor influences RA susceptibility. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(6):1191-4. Epub 2009/08/29.
218. Li X, Chai W, Ni M, Xu M, Lian Z, Shi L, et al. The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *BioMed research international*. 2014;2014:265435. Epub 2014/04/08.
219. Huang XZ, Zhuang JH, Ren YG, Zhou LJ, Zhou Q. [Association of interleukin-6 and interleukin-18 gene polymorphism with rheumatoid arthritis in Guangdong Han population]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2007;27(11):1661-4. Epub 2007/11/21.
220. Amr K, El-Awady R, Raslan H. Assessment of the -174G/C (rs1800795) and -572G/C (rs1800796) Interleukin 6 Gene Polymorphisms in Egyptian Patients with Rheumatoid Arthritis. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2016;4(4):574-7. Epub 2016/12/29.

221. Talaat RM, Alrefaey SA, Bassyouni IH, Ashour ME, Raouf AA. Genetic polymorphisms of interleukin 6 and interleukin 10 in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2016;25(3):255-64. Epub 2015/11/17.
222. Kutluturk F, Yarman S, Sarvan FO, Kekik C. Association of cytokine gene polymorphisms (IL6, IL10, TNF-alpha, TGF-beta and IFN-gamma) and Graves' disease in Turkish population. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2013;13(2):163-7. Epub 2013/05/04.
223. Anvari M, Khalilzadeh O, Esteghamati A, Momen-Heravi F, Mahmoudi M, Esfahani SA, et al. Graves' disease and gene polymorphism of TNF-alpha, IL-2, IL-6, IL-12, and IFN-gamma. *Endocrine*. 2010;37(2):344-8. Epub 2010/10/21.
224. Chen RH, Chang CT, Chen WC, Tsai CH, Tsai FJ. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Hashimoto's thyroiditis patients. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2006;20(6):260-5. Epub 2006/11/23.
225. Duraes C, Moreira CS, Alvelos I, Mendes A, Santos LR, Machado JC, et al. Polymorphisms in the TNFA and IL6 genes represent risk factors for autoimmune thyroid disease. *PloS one*. 2014;9(8):e105492. Epub 2014/08/16.
226. Swafford AD, Howson JM, Davison LJ, Wallace C, Smyth DJ, Schuilenburg H, et al. An allele of IKZF1 (Ikaros) conferring susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia protects against type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(3):1041-4. Epub 2011/01/29.
227. Wang C, Ahlford A, Jarvinen TM, Nordmark G, Eloranta ML, Gunnarsson I, et al. Genes identified in Asian SLE GWASs are also associated with SLE in Caucasian populations. *European journal of human genetics : EJHG*. 2013;21(9):994-9. Epub 2012/12/20.
228. Dawidowicz K, Allanore Y, Guedj M, Pierlot C, Bombardieri S, Balsa A, et al. The interferon regulatory factor 5 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis and influences its erosive phenotype. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(1):117-21. Epub 2010/10/29.
229. Maalej A, Hamad MB, Rebai A, Teixeira VH, Bahloul Z, Marzouk S, et al. Association of IRF5 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in a Tunisian population. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2008;37(6):414-8. Epub 2008/08/30.
230. Negi VS, Muralidharan N, Mehra S, Devaraju P, Mariaselvam CM, Gulati R, et al. IRF5rs2004640 single nucleotide polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in South Indian Tamils. *Tissue antigens*. 2014;84(5):465-70. Epub 2014/10/07.
231. Shimane K, Kochi Y, Yamada R, Okada Y, Suzuki A, Miyatake A, et al. A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(3):377-83. Epub 2008/04/15.
232. Elghzaly AA, Metwally SS, El-Chennawi FA, Elgayaar MA, Mosaad YM, El-Toraby EE, et al. IRF5, PTPN22, CD28, IL2RA, KIF5A, BLK and TNFAIP3 genes polymorphisms and lupus susceptibility in a cohort from the Egypt Delta; relation to other ethnic groups. *Hum Immunol*. 2015;76(7):525-31. Epub 2015/06/21.
233. Hammad A, Mossad YM, Nasef N, Eid R. Interferon regulatory factor 5 gene polymorphism in Egyptian children with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2017;26(8):871-80. Epub 2017/01/07.

234. Tang L, Wan P, Wang Y, Pan J, Chen B. Genetic association and interaction between the IRF5 and TYK2 genes and systemic lupus erythematosus in the Han Chinese population. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2015;64(10):817-24. Epub 2015/08/22.
235. Zervou MI, Dorschner JM, Ghodke-Puranik Y, Boumpas DT, Niewold TB, Goulielmos GN. Association of IRF5 polymorphisms with increased risk for systemic lupus erythematosus in population of Crete, a southern-eastern European Greek island. *Gene*. 2017;610:9-14. Epub 2017/02/12.
236. Coenen MJ, Trynka G, Heskamp S, Franke B, van Diemen CC, Smolonska J, et al. Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Human molecular genetics*. 2009;18(21):4195-203. Epub 2009/08/04.
237. Lessard CJ, Adrianto I, Ice JA, Wiley GB, Kelly JA, Glenn SB, et al. Identification of IRF8, TMEM39A, and IKZF3-ZBP2 as susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in a large-scale multiracial replication study. *American journal of human genetics*. 2012;90(4):648-60. Epub 2012/04/03.
238. Magitta NF, Boe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes and immunity*. 2009;10(2):120-4. Epub 2008/10/24.
239. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *The New England journal of medicine*. 2007;356(12):1216-25. Epub 2007/03/23.
240. Alkhateeb A, Qarqaz F. Genetic association of NALP1 with generalized vitiligo in Jordanian Arabs. *Archives of dermatological research*. 2010;302(8):631-4. Epub 2010/06/25.
241. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(11):2558-62. Epub 2007/07/20.
242. Dwivedi M, Laddha NC, Mansuri MS, Marfatia YS, Begum R. Association of NLRP1 genetic variants and mRNA overexpression with generalized vitiligo and disease activity in a Gujarat population. *The British journal of dermatology*. 2013;169(5):1114-25. Epub 2013/06/19.
243. Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF, Eyre S, Hinks A, Guiducci C, et al. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nature genetics*. 2009;41(12):1313-8. Epub 2009/11/10.
244. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature genetics*. 2004;36(4):337-8. Epub 2004/03/09.
245. Chagastelles PC, Romitti M, Trein MR, Bandinelli E, Tschiedel B, Nardi NB. Association between the 1858T allele of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 and type 1 diabetes in a Brazilian population. *Tissue antigens*. 2010;76(2):144-8. Epub 2010/03/25.
246. Douroudis K, Prans E, Haller K, Nemvalts V, Rajasalu T, Tillmann V, et al. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 gene variants at position 1858 are associated with type 1 and type 2 diabetes in Estonian population. *Tissue antigens*. 2008;72(5):425-30. Epub 2008/09/04.

247. Dultz G, Matheis N, Dittmar M, Rohrig B, Bender K, Kahaly GJ. The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(2):143-8. Epub 2008/12/19.
248. Fedetz M, Matesanz F, Caro-Maldonado A, Smirnov, II, Chvorostinka VN, Moiseenko TA, et al. The 1858T PTPN22 gene variant contributes to a genetic risk of type 1 diabetes in a Ukrainian population. *Tissue antigens*. 2006;67(5):430-3. Epub 2006/05/05.
249. Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A, et al. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes and immunity*. 2005;6(7):628-31. Epub 2005/09/16.
250. Kumar N, Kaur G, Kanga U, Tandon N, Caillat-Zucman S, Mehra NK. Association of PTPN22+1858C/T polymorphism with Type 1 diabetes in the North Indian population. *International journal of immunogenetics*. 2014;41(4):318-23. Epub 2014/06/11.
251. Ladner MB, Bottini N, Valdes AM, Noble JA. Association of the single nucleotide polymorphism C1858T of the PTPN22 gene with type 1 diabetes. *Hum Immunol*. 2005;66(1):60-4. Epub 2004/12/29.
252. Mainardi-Novo DT, Santos AS, Fukui RT, Gamberini M, Correia MR, Ruiz MO, et al. The PTPN22 1858T allele but not variants in the proximal promoter region of IL-21 gene is associated with the susceptibility to type 1 diabetes and the presence of autoantibodies in a Brazilian cohort. *Clinical and experimental immunology*. 2013;172(1):16-22. Epub 2013/03/14.
253. Qu H, Tessier MC, Hudson TJ, Polychronakos C. Confirmation of the association of the R620W polymorphism in the protein tyrosine phosphatase PTPN22 with type 1 diabetes in a family based study. *Journal of medical genetics*. 2005;42(3):266-70. Epub 2005/03/04.
254. Santiago JL, Martinez A, de la Calle H, Fernandez-Arquero M, Figueredo MA, de la Concha EG, et al. Susceptibility to type 1 diabetes conferred by the PTPN22 C1858T polymorphism in the Spanish population. *BMC medical genetics*. 2007;8:54. Epub 2007/08/19.
255. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*. 2004;53(11):3020-3. Epub 2004/10/27.
256. Steck AK, Liu SY, McFann K, Barriga KJ, Babu SR, Eisenbarth GS, et al. Association of the PTPN22/LYP gene with type 1 diabetes. *Pediatric diabetes*. 2006;7(5):274-8. Epub 2006/10/24.
257. Zheng W, She JX. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(3):906-8. Epub 2005/03/01.
258. Zhernakova A, Eerligh P, Wijmenga C, Barrera P, Roep BO, Koeleman BP. Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population. *Genes and immunity*. 2005;6(6):459-61. Epub 2005/05/06.
259. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics*. 2004;75(2):330-7. Epub 2004/06/23.

260. Fodil M, Benzaoui A, Zemani-Fodil F, Aberkane M, Boughrara W, Saidi-Mehtar N, et al. Association of PTPN22 (rs2476601) and STAT4 (rs7574865) polymorphisms with Rheumatoid Arthritis in the Western Algerian population. *Acta reumatologica portuguesa*. 2015;40(1):56-62. Epub 2014/10/30.
261. Harrison P, Pointon JJ, Farrar C, Brown MA, Wordsworth BP. Effects of PTPN22 C1858T polymorphism on susceptibility and clinical characteristics of British Caucasian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(8):1009-11. Epub 2006/02/24.
262. Hashemi M, Atabaki M, Daneshvar H, Zakeri Z, Eskandari-Nasab E. Association of PTPN22 rs2476601 and EGFR rs17337023 Gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Zahedan, Southeast Iran. *International journal of immunogenetics*. 2013;40(4):299-305. Epub 2013/01/29.
263. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, et al. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(6):1694-9. Epub 2005/06/04.
264. Hinks A, Eyre S, Barton A, Thomson W, Worthington J. Investigation of genetic variation across the protein tyrosine phosphatase gene in patients with rheumatoid arthritis in the UK. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(5):683-6. Epub 2006/12/16.
265. Majorczyk E, Jasek M, Ploski R, Wagner M, Kosior A, Pawlik A, et al. Association of PTPN22 single nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis but not with allergic asthma. *European journal of human genetics : EJHG*. 2007;15(10):1043-8. Epub 2007/06/21.
266. Martin JE, Alizadeh BZ, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Gonzalez-Escribano MF, et al. Evidence for PTPN22 R620W polymorphism as the sole common risk variant for rheumatoid arthritis in the 1p13.2 region. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(11):2290-6. Epub 2011/10/04.
267. Mastana S, Gilmour A, Ghelani A, Smith H, Samanta A. Association of PTPN22 with rheumatoid arthritis among South Asians in the UK. *The Journal of rheumatology*. 2007;34(10):1984-6. Epub 2007/08/19.
268. Pierer M, Kaltenhauser S, Arnold S, Wahle M, Baerwald C, Hantzschel H, et al. Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(3):R75. Epub 2006/04/26.
269. Rodriguez-Rodriguez L, Taib WR, Topless R, Steer S, Gonzalez-Escribano MF, Balsa A, et al. The PTPN22 R263Q polymorphism is a risk factor for rheumatoid arthritis in Caucasian case-control samples. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(2):365-72. Epub 2011/02/01.
270. Salama A, Elshazli R, Elsaid A, Settin A. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22) +1858 C>T gene polymorphism in Egyptian cases with rheumatoid arthritis. *Cellular immunology*. 2014;290(1):62-5. Epub 2014/06/02.
271. Seldin MF, Shigeta R, Laiho K, Li H, Saila H, Savolainen A, et al. Finnish case-control and family studies support PTPN22 R620W polymorphism as a risk factor in rheumatoid arthritis, but suggest only minimal or no effect in juvenile idiopathic arthritis. *Genes and immunity*. 2005;6(8):720-2. Epub 2005/08/19.

272. Torres-Carrillo NM, Ruiz-Noa Y, Martinez-Bonilla GE, Leyva-Torres SD, Torres-Carrillo N, Palafox-Sanchez CA, et al. The +1858C/T PTPN22 gene polymorphism confers genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population from the Western Mexico. *Immunology letters*. 2012;147(1-2):41-6. Epub 2012/06/30.
273. van Oene M, Wintle RF, Liu X, Yazdanpanah M, Gu X, Newman B, et al. Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(7):1993-8. Epub 2005/06/30.
274. Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK, Boberg KM, Gilboe IM, Lilleby V, et al. Association analysis of the 1858C>T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. *Genes and immunity*. 2005;6(3):271-3. Epub 2005/03/11.
275. Wesoly J, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Chokkalingam AP, Carlton VE, Begovich AB, et al. Association of the PTPN22 C1858T single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis phenotypes in an inception cohort. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(9):2948-50. Epub 2005/09/08.
276. Yoo YJ, Gao G, Zhang K. Case-control association analysis of rheumatoid arthritis with candidate genes using related cases. *BMC proceedings*. 2007;1 Suppl 1:S33. Epub 2008/05/10.
277. Baca V, Velazquez-Cruz R, Salas-Martinez G, Espinosa-Rosales F, Saldana-Alvarez Y, Orozco L. Association analysis of the PTPN22 gene in childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Genes and immunity*. 2006;7(8):693-5. Epub 2006/10/27.
278. Eliopoulos E, Zervou MI, Andreou A, Dimopoulou K, Cosmidis N, Voloudakis G, et al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetically homogeneous population of Crete. *Lupus*. 2011;20(5):501-6. Epub 2011/05/06.
279. Kaufman KM, Kelly JA, Herring BJ, Adler AJ, Glenn SB, Namjou B, et al. Evaluation of the genetic association of the PTPN22 R620W polymorphism in familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(8):2533-40. Epub 2006/07/27.
280. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *American journal of human genetics*. 2004;75(3):504-7. Epub 2004/07/27.
281. Moez P, Soliman E. Association of PTPN22 gene polymorphism and systemic lupus erythematosus in a cohort of Egyptian patients: impact on clinical and laboratory results. *Rheumatology international*. 2012;32(9):2753-8. Epub 2011/08/06.
282. Ostanek L, Ostanek-Panka M, Bobrowska-Snarska D, Binczak-Kuleta A, Fischer K, Kaczmarczyk M, et al. PTPN22 1858C>T gene polymorphism in patients with SLE: association with serological and clinical results. *Molecular biology reports*. 2014;41(9):6195-200. Epub 2014/07/06.
283. Piotrowski P, Lianeri M, Wudarski M, Lacki JK, Jagodzinski PP. Contribution of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 to systemic lupus erythematosus in Poland. *Clinical and experimental rheumatology*. 2008;26(6):1099-102. Epub 2009/02/13.

284. Reddy MV, Johansson M, Sturfelt G, Jonsen A, Gunnarsson I, Svenungsson E, et al. The R620W C/T polymorphism of the gene PTPN22 is associated with SLE independently of the association of PDCD1. *Genes and immunity*. 2005;6(8):658-62. Epub 2005/07/30.
285. Smith RL, Warren RB, Eyre S, Ke X, Young HS, Allen M, et al. Polymorphisms in the PTPN22 region are associated with psoriasis of early onset. *The British journal of dermatology*. 2008;158(5):962-8. Epub 2008/03/18.
286. Lopez-Cano DJ, Cadena-Sandoval D, Beltran-Ramirez O, Barbosa-Cobos RE, Sanchez-Munoz F, Amezcua-Guerra LM, et al. The PTPN22 R263Q polymorphism confers protection against systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, while PTPN22 R620W confers susceptibility to Graves' disease in a Mexican population. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2017. Epub 2017/05/14.
287. Xue L, Pan C, Gu Z, Zhao S, Han B, Liu W, et al. Genetic heterogeneity of susceptibility gene in different ethnic populations: refining association study of PTPN22 for Graves' disease in a Chinese Han population. *PloS one*. 2013;8(12):e84514. Epub 2014/01/05.
288. Zhebrun D, Kudryashova Y, Babenko A, Maslyansky A, Kunitskaya N, Popcova D, et al. Association of PTPN22 1858T/T genotype with type 1 diabetes, Graves' disease but not with rheumatoid arthritis in Russian population. *Aging*. 2011;3(4):368-73. Epub 2011/04/07.
289. Ichimura M, Kaku H, Fukutani T, Koga H, Mukai T, Miyake I, et al. Associations of protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 (PTPN22) gene polymorphisms with susceptibility to Graves' disease in a Japanese population. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2008;18(6):625-30. Epub 2008/06/27.
290. Skorka A, Bednarczyk T, Bar-Andziak E, Nauman J, Ploski R. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dose-dependent correlation with age of onset. *Clinical endocrinology*. 2005;62(6):679-82. Epub 2005/06/10.
291. Roycroft M, Fichna M, McDonald D, Owen K, Zurawek M, Gryczynska M, et al. The tryptophan 620 allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) gene predisposes to autoimmune Addison's disease. *Clinical endocrinology*. 2009;70(3):358-62. Epub 2008/08/20.
292. Skinningsrud B, Husebye ES, Gervin K, Lovas K, Blomhoff A, Wolff AB, et al. Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. *European journal of human genetics : EJHG*. 2008;16(8):977-82. Epub 2008/02/28.
293. Salinas-Santander M, Sanchez-Dominguez C, Cantu-Salinas C, Gonzalez-Cardenas H, Cepeda-Nieto AC, Cerda-Flores RM, et al. Association between PTPN22 C1858T polymorphism and alopecia areata risk. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;10(5):1953-8. Epub 2015/12/08.
294. El-Zawahry BM, Azzam OA, Zaki NS, Abdel-Raheem HM, Bassiouny DA, Khorshied MM. PTPN22 gene polymorphism in Egyptian alopecia areata patients and its impact on response to diphencyprone immunotherapy. *Gene*. 2013;523(2):147-51. Epub 2013/04/11.
295. Betz RC, Konig K, Flaquer A, Redler S, Eigelshoven S, Kortum AK, et al. The R620W polymorphism in PTPN22 confers general susceptibility for the development of

- alopecia areata. *The British journal of dermatology*. 2008;158(2):389-91. Epub 2007/11/22.
296. Canton I, Akhtar S, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, Blomhoff A, Watson PF, et al. A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. *Genes and immunity*. 2005;6(7):584-7. Epub 2005/07/15.
297. Garcia-Melendez ME, Salinas-Santander M, Sanchez-Dominguez C, Gonzalez-Cardenas H, Cerda-Flores RM, Ocampo-Candiani J, et al. Protein tyrosine phosphatase PTPN22 +1858C/T polymorphism is associated with active vitiligo. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;8(5):1433-7. Epub 2014/10/08.
298. LaBerge GS, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. PTPN22 is genetically associated with risk of generalized vitiligo, but CTLA4 is not. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(7):1757-62. Epub 2008/01/18.
299. Laberge GS, Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. The PTPN22-1858C>T (R620W) functional polymorphism is associated with generalized vitiligo in the Romanian population. *Pigment cell & melanoma research*. 2008;21(2):206-8. Epub 2008/04/23.
300. Quan C, Ren YQ, Xiang LH, Sun LD, Xu AE, Gao XH, et al. Genome-wide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and the MHC. *Nature genetics*. 2010;42(7):614-8. Epub 2010/06/08.
301. Eyre S, Hinks A, Flynn E, Martin P, Wilson AG, Maxwell JR, et al. Confirmation of association of the REL locus with rheumatoid arthritis susceptibility in the UK population. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(8):1572-3. Epub 2009/12/01.
302. Khalifa O, Zemni R, Ben Hassine H, Zaglaoui H, Bouagina E, Slama F, et al. REL polymorphisms and rheumatoid arthritis in the Tunisian population. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2012;79(5):521-2. Epub 2012/03/31.
303. Zhou XJ, Lu XL, Nath SK, Lv JC, Zhu SN, Yang HZ, et al. Gene-gene interaction of BLK, TNFSF4, TRAF1, TNFAIP3, and REL in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(1):222-31. Epub 2011/09/10.
304. Ali FR, Barton A, Smith RL, Bowes J, Flynn E, Mangino M, et al. An investigation of rheumatoid arthritis loci in patients with early-onset psoriasis validates association of the REL gene. *The British journal of dermatology*. 2013;168(4):864-6. Epub 2012/10/31.
305. Bi C, Li B, Cheng Z, Hu Y, Fang Z, Zhai A. Association study of STAT4 polymorphisms and type 1 diabetes in Northeastern Chinese Han population. *Tissue antigens*. 2013;81(3):137-40. Epub 2013/01/31.
306. Martinez A, Varade J, Marquez A, Cenit MC, Espino L, Perdigonés N, et al. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(9):2598-602. Epub 2008/09/02.
307. Zervou MI, Mamoulakis D, Panierakis C, Boumpas DT, Goulielmos GN. STAT4: a risk factor for type 1 diabetes? *Hum Immunol*. 2008;69(10):647-50. Epub 2008/08/16.
308. Kobayashi S, Ikari K, Kaneko H, Kochi Y, Yamamoto K, Shimane K, et al. Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(7):1940-6. Epub 2008/06/26.
309. Liang YL, Wu H, Li PQ, Xie XD, Shen X, Yang XQ, et al. Signal transducer and activator of transcription 4 gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis in

- Northwestern Chinese Han population. *Life sciences*. 2011;89(5-6):171-5. Epub 2011/06/21.
310. Palomino-Morales RJ, Rojas-Villarraga A, Gonzalez CI, Ramirez G, Anaya JM, Martin J. STAT4 but not TRAF1/C5 variants influence the risk of developing rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Colombians. *Genes and immunity*. 2008;9(4):379-82. Epub 2008/04/25.
311. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*. 2007;357(10):977-86. Epub 2007/09/07.
312. Settin A, Salama A, Elshazli R. Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) G>T gene polymorphism in Egyptian cases with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2014;75(8):863-6. Epub 2014/07/01.
313. Shen L, Liu R, Zhang H, Huang Y, Sun R, Tang P. Replication study of STAT4 rs7574865 G/T polymorphism and risk of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Gene*. 2013;526(2):259-64. Epub 2013/06/04.
314. Stark K, Rovensky J, Blazickova S, Grosse-Wilde H, Ferencik S, Hengstenberg C, et al. Association of common polymorphisms in known susceptibility genes with rheumatoid arthritis in a Slovak population using osteoarthritis patients as controls. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):R70. Epub 2009/05/19.
315. Zervou MI, Sidiropoulos P, Petraki E, Vazgiourakis V, Krasoudaki E, Raptopoulou A, et al. Association of a TRAF1 and a STAT4 gene polymorphism with increased risk for rheumatoid arthritis in a genetically homogeneous population. *Hum Immunol*. 2008;69(9):567-71. Epub 2008/07/16.
316. Zhao Y, Liu X, Su Y, Li Y, Zhang X, Zhu L, et al. Association of STAT4 gene polymorphism with increased susceptibility of rheumatoid arthritis in a northern Chinese Han subpopulation. *International journal of rheumatic diseases*. 2013;16(2):178-84. Epub 2013/06/19.
317. Alonso-Perez E, Suarez-Gestal M, Calaza M, Ordi-Ros J, Balada E, Bijl M, et al. Further evidence of subphenotype association with systemic lupus erythematosus susceptibility loci: a European cases only study. *PloS one*. 2012;7(9):e45356. Epub 2012/10/11.
318. Ciccacci C, Perricone C, Ceccarelli F, Rufini S, Di Fusco D, Alessandri C, et al. A multilocus genetic study in a cohort of Italian SLE patients confirms the association with STAT4 gene and describes a new association with HCP5 gene. *PloS one*. 2014;9(11):e111991. Epub 2014/11/05.
319. Dang J, Shan S, Li J, Zhao H, Xin Q, Liu Y, et al. Gene-gene interactions of IRF5, STAT4, IKZF1 and ETS1 in systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens*. 2014;83(6):401-8. Epub 2014/04/05.
320. Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Ohashi J, Hayashi T, Goto D, et al. Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the STAT1-STAT4 region. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(5):R113. Epub 2008/09/23.
321. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Tada Y, Asami T, Ide S, et al. Cigarette smoking, STAT4 and TNFRSF1B polymorphisms, and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *The Journal of rheumatology*. 2009;36(10):2195-203. Epub 2009/08/18.

322. Li P, Cao C, Luan H, Li C, Hu C, Zhang S, et al. Association of genetic variations in the STAT4 and IRF7/KIAA1542 regions with systemic lupus erythematosus in a Northern Han Chinese population. *Hum Immunol.* 2011;72(3):249-55. Epub 2010/12/21.
323. Mirkazemi S, Akbarian M, Jamshidi AR, Mansouri R, Ghoroghi S, Salimi Y, et al. Association of STAT4 rs7574865 with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Iranian population. *Inflammation.* 2013;36(6):1548-52. Epub 2013/08/06.
324. Su Y, Zhao Y, Liu X, Guo JP, Jiang Q, Liu XY, et al. Variation in STAT4 is associated with systemic lupus erythematosus in Chinese Northern Han population. *Chinese medical journal.* 2010;123(22):3173-7. Epub 2010/12/18.
325. Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, Tosca AD, Krueger-Krasagakis S. STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece. *Hum Immunol.* 2009;70(9):738-41. Epub 2009/06/09.
326. Yan N, Meng S, Zhou J, Xu J, Muhali FS, Jiang W, et al. Association between STAT4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid diseases in a Chinese population. *International journal of molecular sciences.* 2014;15(7):12280-93. Epub 2014/07/16.
327. Park Y, Lee HS, Min D, Yang S, Kim D, Cho B. Evidence for the role of STAT4 as a general autoimmunity locus in the Korean population. *Diabetes/metabolism research and reviews.* 2011;27(8):867-71. Epub 2011/11/10.
328. Park Y, Park S, Yoo E, Kim D, Shin H. Association of the polymorphism for Toll-like receptor 2 with type 1 diabetes susceptibility. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004;1037:170-4. Epub 2005/02/09.
329. Bjornvold M, Munthe-Kaas MC, Egeland T, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Njolstad PR, et al. A TLR2 polymorphism is associated with type 1 diabetes and allergic asthma. *Genes and immunity.* 2009;10(2):181-7. Epub 2009/01/17.
330. Shi G, Wang T, Li S, Cheng Y, Sheng P, Fan Y, et al. TLR2 and TLR4 polymorphisms in Southern Chinese Psoriasis Vulgaris patients. *Journal of dermatological science.* 2016;83(2):145-7. Epub 2016/05/09.
331. Karaca N, Ozturk G, Gerceker BT, Turkmen M, Berdeli A. TLR2 and TLR4 gene polymorphisms in Turkish vitiligo patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV.* 2013;27(1):e85-90. Epub 2012/03/21.
332. Stayoussef M, Benmansour J, Al-Jenaidi FA, Rajab MH, Said HB, Ourtani M, et al. Identification of specific tumor necrosis factor-alpha-susceptible and -protective haplotypes associated with the risk of type 1 diabetes. *European cytokine network.* 2010;21(4):285-91. Epub 2010/11/26.
333. Shin HD, Yang SW, Kim DH, Park Y. Independent association of tumor necrosis factor polymorphism with type 1 diabetes susceptibility. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2008;1150:76-85. Epub 2009/01/06.
334. Korolija M, Hadzija M, Medvidovic EP, Pavkovic P, Kapitanovic S, Renar IP, et al. Genetic evaluation of the TNF-alpha -238G>A and -308G>A promoter polymorphisms in Croatian patients with type I diabetes. *Hum Immunol.* 2010;71(12):1228-32. Epub 2010/09/21.
335. Boraska V, Zeggini E, Groves CJ, Rayner NW, Skrabic V, Diakite M, et al. Family-based analysis of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha tag polymorphisms with type 1 diabetes in the population of South Croatia. *Hum Immunol.* 2009;70(3):195-9. Epub 2009/01/27.

336. Seki N, Kamizono S, Yamada A, Higuchi T, Matsumoto H, Niiya F, et al. Polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue antigens*. 1999;54(2):194-7. Epub 1999/09/17.
337. Balog A, Gal J, Gyulai Z, Zsilak S, Mandi Y. Tumour necrosis factor-alpha and heat-shock protein 70-2 gene polymorphisms in a family with rheumatoid arthritis. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 2004;51(3):263-9. Epub 2004/12/02.
338. Gu LQ, Zhu W, Pan CM, Zhao L, Zhang MJ, Liu JM, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) polymorphisms in Chinese patients with Graves' disease. *Clinical biochemistry*. 2010;43(3):223-7. Epub 2009/09/08.
339. Nakkuntod J, Wongsurawat T, Charoenwongse P, Snaboon T, Sridama V, Hirankarn N. Association of TNF-alpha, TNF-beta, IFN-gamma and IL-1Ra gene polymorphisms with Graves' disease in the Thai population. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2006;24(4):207-11. Epub 2007/03/14.
340. Bougacha-Elleuch N, Rebai A, Mnif M, Makni H, Bellassouad M, Jouida J, et al. Analysis of MHC genes in a Tunisian isolate with autoimmune thyroid diseases: implication of TNF -308 gene polymorphism. *Journal of autoimmunity*. 2004;23(1):75-80. Epub 2004/07/09.
341. Cristina CS, Mauricio SS, Armando LR, Celia SD, Clara RI, Rocio OL, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter-308G/A polymorphism in Mexican patients with patchy alopecia areata. *International journal of dermatology*. 2012;51(5):571-5. Epub 2012/04/21.
342. Al-Harhi F, Zouman A, Arfin M, Tariq M, Al-Asmari A. Tumor necrosis factor-alpha and -beta genetic polymorphisms as a risk factor in Saudi patients with vitiligo. *Genetics and molecular research : GMR*. 2013;12(3):2196-204. Epub 2013/07/26.
343. Laddha NC, Dwivedi M, Begum R. Increased Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha and its promoter polymorphisms correlate with disease progression and higher susceptibility towards vitiligo. *PloS one*. 2012;7(12):e52298. Epub 2013/01/04.
344. Salinas-Santander M, Diaz-Garcia D, Rojas-Martinez A, Cantu-Salinas C, Sanchez-Dominguez C, Reyes-Lopez M, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A polymorphism is associated with active vitiligo vulgaris in a northeastern Mexican population. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012;3(5):893-7. Epub 2012/09/13.
345. Namian AM, Shahbaz S, Salmanpoor R, Namazi MR, Dehghani F, Kamali-Sarvestani E. Association of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha polymorphisms with susceptibility to vitiligo in Iranian patients. *Archives of dermatological research*. 2009;301(1):21-5. Epub 2008/09/30.
346. Fung EY, Smyth DJ, Howson JM, Cooper JD, Walker NM, Stevens H, et al. Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes and immunity*. 2009;10(2):188-91. Epub 2008/12/27.
347. Hao G, Li Y, Liu J, Wo M. TNFAIP3 rs2230926 polymorphisms in rheumatoid arthritis of southern Chinese Han population: a case-control study. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(12):8958-61. Epub 2015/02/13.
348. Moaaz M, Mohannad N. Association of the polymorphisms of TRAF1 (rs10818488) and TNFAIP3 (rs2230926) with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus and their relationship to disease activity among Egyptian patients. *Central-European journal of immunology*. 2016;41(2):165-75. Epub 2016/08/19.

349. Perkins EA, Landis D, Causey ZL, Edberg Y, Reynolds RJ, Hughes LB, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in CCR6, TAGAP, and TNFAIP3 with rheumatoid arthritis in African Americans. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(5):1355-8. Epub 2011/12/01.
350. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, et al. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(2):574-9. Epub 2010/01/30.
351. Zhang X, Li W, Zhao L, Jiang L, Guo Y, Zhang J, et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 were associated with the risks of rheumatoid arthritis in northern Chinese Han population. *BMC medical genetics*. 2014;15:56. Epub 2014/06/03.
352. Cai LQ, Wang ZX, Lu WS, Han JW, Sun LD, Du WH, et al. A single-nucleotide polymorphism of the TNFAIP3 gene is associated with systemic lupus erythematosus in Chinese Han population. *Molecular biology reports*. 2010;37(1):389-94. Epub 2009/09/24.
353. Han JW, Wang Y, Li HB, Alateng C, Bai YH, Sun ZQ, et al. Single nucleotide polymorphisms of TNFAIP3 are associated with systemic lupus erythematosus in Han Chinese population. *International journal of immunogenetics*. 2016;43(2):96-100. Epub 2016/02/06.
354. Kawasaki A, Ito I, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, et al. Association of TNFAIP3 polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:207578. Epub 2010/07/10.
355. Kim SK, Park HJ, Chung JH, Kim JW, Seok H, Lew BL, et al. Association between interleukin 18 polymorphisms and alopecia areata in Koreans. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2014;34(5):349-53. Epub 2014/01/23.
356. Lodolce JP, Kolodziej LE, Rhee L, Kariuki SN, Franek BS, McGreal NM, et al. African-derived genetic polymorphisms in TNFAIP3 mediate risk for autoimmunity. *J Immunol*. 2010;184(12):7001-9. Epub 2010/05/21.
357. Zhong H, Li XL, Li M, Hao LX, Chen RW, Xiang K, et al. Replicated associations of TNFAIP3, TNIP1 and ETS1 with systemic lupus erythematosus in a southwestern Chinese population. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(6):R186. Epub 2011/11/18.
358. Haase O, Mosaad H, Eldarouti MA, Elramly AZ, Samir N, Abdelhady MM, et al. TNFAIP3 and IL12B gene polymorphisms associated with psoriasis vulgaris in an Egyptian cohort. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2015;29(7):1297-301. Epub 2014/11/19.
359. Indhumathi S, Rajappa M, Chandrashekar L, Ananthanarayanan PH, Thappa DM, Negi VS. TNFAIP3 and TNIP1 polymorphisms confer psoriasis risk in South Indian Tamils. *British journal of biomedical science*. 2015;72(4):168-73. Epub 2016/01/08.
360. Li XL, Yu H, Wu GS. Investigating the genetic association of HCP5, SPATA2, TNIP1, TNFAIP3 and COG6 with psoriasis in Chinese population. *International journal of immunogenetics*. 2014;41(6):503-7. Epub 2014/09/30.

361. Zhang C, Zhu KJ, Liu H, Quan C, Liu Z, Li SJ, et al. The TNFAIP3 polymorphism rs610604 both associates with the risk of psoriasis vulgaris and affects the clinical severity. *Clinical and experimental dermatology*. 2015;40(4):426-30. Epub 2014/12/17.
362. Song RH, Yu ZY, Wang Q, Muhali FS, Jiang WJ, Xiao L, et al. Polymorphisms of the TNFAIP3 region and Graves' disease. *Autoimmunity*. 2014;47(7):459-65. Epub 2014/05/07.
363. Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, et al. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(5):R174. Epub 2010/09/21.
364. Zhang DM, Cheng LQ, Zhai ZF, Feng L, Zhong BY, You Y, et al. Single-nucleotide polymorphism and haplotypes of TNIP1 associated with systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *The Journal of rheumatology*. 2013;40(9):1535-44. Epub 2013/07/17.
365. Zuo XB, Sheng YJ, Hu SJ, Gao JP, Li Y, Tang HY, et al. Variants in TNFSF4, TNFAIP3, TNIP1, BLK, SLC15A4 and UBE2L3 interact to confer risk of systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Rheumatology international*. 2014;34(4):459-64. Epub 2013/10/05.
366. Cooper JD, Walker NM, Smyth DJ, Downes K, Healy BC, Todd JA. Follow-up of 1715 SNPs from the Wellcome Trust Case Control Consortium genome-wide association study in type 1 diabetes families. *Genes and immunity*. 2009;10 Suppl 1:S85-94. Epub 2009/12/04.
367. Diaz-Gallo LM, Sanchez E, Ortego-Centeno N, Sabio JM, Garcia-Hernandez FJ, de Ramon E, et al. Evidence of new risk genetic factor to systemic lupus erythematosus: the UBASH3A gene. *PLoS one*. 2013;8(4):e60646. Epub 2013/04/09.
368. Liu J, Ni J, Leng RX, Pan HF, Ye DQ. Association of UBASH3A gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Gene*. 2015;565(1):116-21. Epub 2015/04/07.
369. Plagnol V, Howson JM, Smyth DJ, Walker N, Hafler JP, Wallace C, et al. Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. *PLoS genetics*. 2011;7(8):e1002216. Epub 2011/08/11.
370. Abd-Allah SH, Pasha HF, Hagrass HA, Alghobashy AA. Vitamin D status and vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Egyptian children. *Gene*. 2014;536(2):430-4. Epub 2013/12/29.
371. Cheon CK, Nam HK, Lee KH, Kim SY, Song JS, Kim C. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus in a Korean population. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2015;57(5):870-4. Epub 2015/03/27.
372. Kamel MM, Fouad SA, Salaheldin O, El-Razek Ael R, El-Fatah AI. Impact of vitamin D receptor gene polymorphisms in pathogenesis of Type-1 diabetes mellitus. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7(12):5505-10. Epub 2015/02/11.
373. Mimbacas A, Trujillo J, Gascue C, Javiel G, Cardoso H. Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphism in a Uruguayan population and its relation to type 1 diabetes mellitus. *Genetics and molecular research : GMR*. 2007;6(3):534-42. Epub 2007/11/07.

374. Maalej A, Petit-Teixeira E, Michou L, Rebai A, Cornelis F, Ayadi H. Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population. *Genes and immunity*. 2005;6(8):707-11. Epub 2005/09/10.
375. Karray EF, Ben Dhifallah I, Ben Abdelghani K, Ben Ghorbel I, Khanfir M, Houman H, et al. Associations of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI with susceptibility to rheumatoid arthritis and Behcet's disease in Tunisians. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2012;79(2):144-8. Epub 2011/08/09.
376. Cavalcanti CA, Silva Jde A, Pita Wde B, Veit TD, Monticelo OA, Xavier RM, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and expression profile in rheumatoid arthritis Brazilian patients. *Molecular biology reports*. 2016;43(1):41-51. Epub 2015/12/22.
377. Azab SF, Ali YF, Farghaly MA, Hamed ME, Allah MA, Emam AA, et al. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Egyptian children and adolescents with systemic lupus erythematosus: A case-control study. *Medicine*. 2016;95(46):e5233. Epub 2016/11/20.
378. Chen XE, Chen P, Chen SS, Lu J, Ma T, Shi G, et al. A population association study of vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes with the risk of systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Immunologic research*. 2017;65(3):750-6. Epub 2017/03/13.
379. Emerah AA, El-Shal AS. Role of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D level in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus. *Molecular biology reports*. 2013;40(11):6151-62. Epub 2013/09/24.
380. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron*. 2000;85(1):86-91. Epub 2000/04/25.
381. Meng S, He ST, Jiang WJ, Xiao L, Li DF, Xu J, et al. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid diseases in a Chinese Han population: Role of vitamin D receptor gene polymorphisms. *Annales d'endocrinologie*. 2015;76(6):684-9. Epub 2015/11/26.
382. Abd El Gawad SS, Abdul Samee ER, Metwali AA, Abd El Gawad MS. Vitamin D receptor gene polymorphism and its association with 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in patients with Graves disease in an Egyptian population: a pilot study. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2012;18(2):132-9. Epub 2011/08/02.
383. Inoue N, Watanabe M, Ishido N, Katsumata Y, Kagawa T, Hidaka Y, et al. The functional polymorphisms of VDR, GC and CYP2R1 are involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clinical and experimental immunology*. 2014;178(2):262-9. Epub 2014/07/22.
384. Stefanic M, Karner I, Glavas-Obrovac L, Papic S, Vrdoljak D, Levak G, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with susceptibility to Graves' disease in Eastern Croatian population: case-control study. *Croatian medical journal*. 2005;46(4):639-46. Epub 2005/08/16.
385. Ramos-Lopez E, Kurylowicz A, Bednarczuk T, Paunkovic J, Seidl C, Badenhoop K. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2005;15(10):1125-30. Epub 2005/11/11.

386. Ban Y, Taniyama M. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with Graves' disease in the Japanese population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(12):4639-43. Epub 2001/01/03.
387. Djurovic J, Stojkovic O, Ozdemir O, Silan F, Akurut C, Todorovic J, et al. Association between FokI, Apal and TaqI RFLP polymorphisms in VDR gene and Hashimoto's thyroiditis: preliminary data from female patients in Serbia. *International journal of immunogenetics*. 2015;42(3):190-4. Epub 2015/03/31.
388. Yazici D, Yavuz D, Tarcin O, Sancak S, Deyneli O, Akalin S. Vitamin D receptor gene Apal, TaqI, FokI and BsmI polymorphisms in a group of Turkish patients with Hashimoto's thyroiditis. *Minerva endocrinologica*. 2013;38(2):195-201. Epub 2013/06/05.
389. Lin WY, Wan L, Tsai CH, Chen RH, Lee CC, Tsai FJ. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with risk of Hashimoto's thyroiditis in Chinese patients in Taiwan. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2006;20(3):109-12. Epub 2006/05/25.
390. Pani MA, Seissler J, Usadel KH, Badenhop K. Vitamin D receptor genotype is associated with Addison's disease. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2002;147(5):635-40. Epub 2002/11/26.
391. Aydingoz IE, Bingul I, Dogru-Abbasoglu S, Vural P, Uysal M. Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in vitiligo. *Dermatology*. 2012;224(4):361-8. Epub 2012/06/29.
392. Li K, Shi Q, Yang L, Li X, Liu L, Wang L, et al. The association of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D levels with generalized vitiligo. *The British journal of dermatology*. 2012;167(4):815-21. Epub 2012/07/06.
393. Limou S, Taverner AM, Winkler CA. Ferret: a user-friendly Java tool to extract data from the 1000 Genomes Project. *Bioinformatics*. 2016;32(14):2224-6. Epub 2016/05/07.
394. van Geel N, Speeckaert R. Segmental Vitiligo. *Dermatologic Clinics*. 2017;35(2):145-50.
395. Borradaile D, Kimlin M. Vitamin D in health and disease: an insight into traditional functions and new roles for the 'sunshine vitamin'. *Nutrition research reviews*. 2009;22(2):118-36. Epub 2009/11/11.
396. Signorello LB, Shi J, Cai Q, Zheng W, Williams SM, Long J, et al. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PloS one*. 2011;6(12):e28623. Epub 2011/12/30.
397. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2006;5(2):114-7. Epub 2006/01/25.
398. Sharma R, Saigal R, Goyal L, Mital P, Yadav RN, Meena PD, et al. Estimation of vitamin D levels in rheumatoid arthritis patients and its correlation with the disease activity. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2014;62(8):678-81. Epub 2015/04/11.
399. Feng R, Li Y, Li G, Li Z, Zhang Y, Li Q, et al. Lower serum 25 (OH) D concentrations in type 1 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes research and clinical practice*. 2015;108(3):e71-5. Epub 2015/04/04.
400. Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):441-7. Epub 2008/08/12.

401. Wjst M, Altmuller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, Andre E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respiratory research*. 2006;7:60. Epub 2006/04/08.
402. Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, Hicks PJ, Rich SS, Wagenknecht LE, et al. Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hispanic and African Americans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(9):3381-8. Epub 2008/07/03.
403. Sundqvist E, Baarnhielm M, Alfredsson L, Hillert J, Olsson T, Kockum I. Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *European journal of human genetics : EJHG*. 2010;18(12):1349-52. Epub 2010/07/22.
404. (ANZgene) TAaNZMSGC. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nature genetics*. 2009;41(7):824-8. Epub 2009/06/16.
405. Zhuang JC, Huang ZY, Zhao GX, Yu H, Li ZX, Wu ZY. Variants of CYP27B1 are associated with both multiple sclerosis and neuromyelitis optica patients in Han Chinese population. *Gene*. 2015;557(2):236-9. Epub 2014/12/30.
406. Simon KC, Munger KL, Kraft P, Hunter DJ, De Jager PL, Ascherio A. Genetic predictors of 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Journal of neurology*. 2011;258(9):1676-82. Epub 2011/03/25.
407. Gregersen PK, Amos CI, Lee AT, Lu Y, Remmers EF, Kastner DL, et al. REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nature genetics*. 2009;41(7):820-3. Epub 2009/06/09.
408. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical chemistry*. 1999;45(1):7-17. Epub 1999/01/23.
409. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Perez-Pampin E, Costas J, Torres M, et al. Genetic variation in the nuclear factor kappaB pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(4):579-83. Epub 2008/04/25.
410. Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nature genetics*. 2012;44(12):1336-40.
411. Izzo V, Pinelli M, Tinto N, Esposito MV, Cola A, Sperandeo MP, et al. Improving the estimation of celiac disease sibling risk by non-HLA genes. *PloS one*. 2011;6(11):e26920. Epub 2011/11/17.
412. Sperandeo MP, Tosco A, Izzo V, Tucc F, Troncone R, Auricchio R, et al. Potential Celiac Patients: A Model of Celiac Disease Pathogenesis. *PloS one*. 2011;6(7).
413. Trynka G, Zhernakova A, Romanos J, Franke L, Hunt KA, Turner G, et al. Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut*. 2009;58(8):1078-83. Epub 2009/02/26.
414. Zhernakova A, Festen EM, Franke L, Trynka G, van Diemen CC, Monsuur AJ, et al. Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *American journal of human genetics*. 2008;82(5):1202-10. Epub 2008/04/29.

415. Chen F, Xu L, Zhao T, Xiao X, Pan Y, Hou S. Genetic Variation in the REL Gene Increases Risk of Behcet's Disease in a Chinese Han Population but That of PRKCQ Does Not. *PLoS one*. 2016;11(1):e0147350. Epub 2016/01/20.
416. Spielmann M, Mundlos S. Looking beyond the genes: the role of non-coding variants in human disease. *Human molecular genetics*. 2016;25(R2):R157-R65. Epub 2016/06/30.
417. Spielmann M, Klopocki E. CNVs of noncoding cis-regulatory elements in human disease. *Current opinion in genetics & development*. 2013;23(3):249-56. Epub 2013/04/23.
418. Doss RW, El-Rifaie AA, Abdel-Wahab AM, Gohary YM, Rashed LA. Heat Shock Protein-70 Expression in Vitiligo and its Relation to the Disease Activity. *Indian journal of dermatology*. 2016;61(4):408-12. Epub 2016/08/12.
419. Abdou AG, Marae AH, Reyad W. Immunohistochemical expression of heat shock protein 70 in vitiligo. *Annals of diagnostic pathology*. 2013;17(3):245-9. Epub 2013/01/29.
420. Denman CJ, McCracken J, Hariharan V, Klarquist J, Oyarbide-Valencia K, Guevara-Patino JA, et al. HSP70i accelerates depigmentation in a mouse model of autoimmune vitiligo. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(8):2041-8. Epub 2008/03/14.
421. Ippoliti F, Frediani T, Santis WD, Lucarelli S, Canitano N, Frediani S, et al. The role of heat shock proteins (HSPs) in vitiligo: deviation of cytotoxic response? *Journal of dermatological science*. 2005;37(2):114-7. Epub 2005/01/22.
422. Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends in immunology*. 2009;30(8):383-91. Epub 2009/08/01.
423. Kim SK, Choe JY, Bae J, Chae SC, Park DJ, Kwak SG, et al. TNFAIP3 gene polymorphisms associated with differential susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Korean population. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(6):1009-13. Epub 2014/02/04.
424. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annual review of immunology*. 2008;26:57-79. Epub 2007/10/24.
425. Brandt K, Singh PB, Bulfone-Paus S, Ruckert R. Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2007;18(3-4):223-32. Epub 2007/05/19.
426. Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol*. 2004;172(7):3983-8. Epub 2004/03/23.
427. Cheng LE, Ohlen C, Nelson BH, Greenberg PD. Enhanced signaling through the IL-2 receptor in CD8+ T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8+ T cells rather than promotion of cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(5):3001-6. Epub 2002/02/28.
428. Rokni GR, Golpour M, Gorji AH, Khalilian A, Ghasemi H. Effectiveness and safety of topical tacrolimus in treatment of vitiligo. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2017;8(1):29-33. Epub 2017/02/22.
429. Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE, Leonard WJ. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood*. 2007;109(10):4135-42. Epub 2007/01/20.

430. Zhernakova A, Alizadeh BZ, Bevova M, van Leeuwen MA, Coenen MJ, Franke B, et al. Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *American journal of human genetics*. 2007;81(6):1284-8. Epub 2007/11/14.
431. Shi YL, Li K, Hamzavi I, Lim HW, Zhou L, Mi QS. Elevated circulating soluble interleukin-2 receptor in patients with non-segmental vitiligo in North American. *Journal of dermatological science*. 2013;71(3):212-4. Epub 2013/07/23.
432. Khan R, Gupta S, Sharma A. Circulatory levels of T-cell cytokines (interleukin [IL]-2, IL-4, IL-17, and transforming growth factor-beta) in patients with vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;66(3):510-1. Epub 2012/02/22.
433. Singh S, Singh U, Pandey SS. Serum concentration of IL-6, IL-2, TNF-alpha, and IFN-gamma in Vitiligo patients. *Indian journal of dermatology*. 2012;57(1):12-4. Epub 2012/04/04.
434. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(10):683-91. Epub 2011/09/01.
435. Yousefi A, Mahmoudi E, Baradaran Noveiry B, Zare Bidoki A, Sadr M, Motamed F, et al. Autoimmune hepatitis association with single nucleotide polymorphism of interleukin-2, but not interferon-gamma. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2018;42(2):134-8. Epub 2017/12/31.
436. Ramasamy A, Curjuric I, Coin LJ, Kumar A, McArdle WL, Imboden M, et al. A genome-wide meta-analysis of genetic variants associated with allergic rhinitis and grass sensitization and their interaction with birth order. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(5):996-1005. Epub 2011/11/01.
437. Henneman P, Petrus NCM, Venema A, van Sinderen F, van der Lip K, Hennekam RC, et al. Genetic susceptibility for cow's milk allergy in Dutch children: the start of the allergic march? *Clinical and translational allergy*. 2015;6:7. Epub 2015/01/01.
438. Espino-Paisan L, De La Calle H, Fernandez-Arquero M, Figueredo MA, De La Concha EG, Urcelay E, et al. Study of polymorphisms in 4q27, 10p15, and 22q13 regions in autoantibodies stratified type 1 diabetes patients. *Autoimmunity*. 2011;44(8):624-30. Epub 2011/08/31.
439. Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER. No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *American journal of human genetics*. 2007;80(3):531-8. Epub 2007/02/03.
440. Zaykin DV, Shibata K. Genetic flip-flop without an accompanying change in linkage disequilibrium. *American journal of human genetics*. 2008;82(3):794-6; author reply 6-7. Epub 2008/03/06.
441. Gutierrez-Achury J, Zorro MM, Ricano-Ponce I, Zhernakova DV, Diogo D, Raychaudhuri S, et al. Functional implications of disease-specific variants in loci jointly associated with coeliac disease and rheumatoid arthritis. *Human molecular genetics*. 2016;25(1):180-90. Epub 2015/11/08.
442. Anbar TS, Abdel-Rahman A.T., Ghannam S., Hosan El-Din W., El-Khayyat M.A. Are segmental and non-segmental vitiligo different disease entities? Clinical profile of 1100 vitiligo patients. *Egyptian Dermatology Online Journal*. 2006;2(3).
443. Mazereeuw-Hautier J, Bezio S, Mahe E, Bodemer C, Eschard C, Viseux V, et al. Segmental and nonsegmental childhood vitiligo has distinct clinical characteristics: a

- prospective observational study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010;62(6):945-9. Epub 2010/05/15.
444. Silva de Castro CC, do Nascimento LM, Olandoski M, Mira MT. A pattern of association between clinical form of vitiligo and disease-related variables in a Brazilian population. *Journal of dermatological science*. 2012;65(1):63-7. Epub 2011/10/28.
445. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research*. 2010;38(Web Server issue):W214-20. Epub 2010/07/02.
446. Gilmore TD, Gerondakis S. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes & cancer*. 2011;2(7):695-711. Epub 2011/12/31.
447. Ramakrishnan P, Yui MA, Tomalka JA, Majumdar D, Parameswaran R, Baltimore D. Deficiency of Nuclear Factor-kappaB c-Rel Accelerates the Development of Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Diabetes*. 2016;65(8):2367-79. Epub 2016/05/25.
448. Frank Kontgen, Raelene J. Grumont, Andreas Strasser, Donald Metcalf, Ruili Li, David Tarlinton, et al. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes and Development*. 1995;9:1965-77.

ANEXO I: APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF PARANÁ

RESEARCH ETHICS COMMITTEE

Curitiba (Brazil), 2008-02-12

To whom it may concerns

We hereby, certify that the study entitled "**ESTUDO DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO**" (PORTUGUESE VERSION), was submitted to the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná. After analysis the project was approved for execution at the committee meeting of **September 5, 2007**, under the protocol number **1975**.

The protocol was submitted and approved by the Brazilian National Commission on Ethics in Research (CONEP), under the protocol number **14394**.

Prof. Sergio Surugi de Siqueira, Ph.D.

Coordinator

Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná



ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Susceptibilidade ao vitiligo

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) estará realizando um estudo que irá investigar o papel da genética na susceptibilidade ao vitiligo e na gravidade da doença. Se bem sucedido, o projeto poderá facilitar o tratamento do vitiligo e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, seus familiares e pessoas próximas. Este estudo será coordenado por Dr. Marcelo Távora Mira, professor adjunto e pesquisador do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR.

1) Métodos

Se você concordar em participar neste estudo, você será submetido a um exame médico e coleta de uma amostra de sangue de seu antebraço, com uma agulha nova e descartável, após assepsia local (limpeza). A amostra de sangue será usada para extração de ácidos nucleicos (DNA, seu material genético). O DNA será enviado a um laboratório para um teste chamado “genotipagem” que irá permitir aos cientistas estudar as características genéticas que tornam mais fácil para alguns indivíduos e seus familiares contrair vitiligo e desenvolver os diferentes tipos clínicos da doença. Sob sua autorização, informações de prontuários clínicos também poderão ser lidas pelos cientistas e utilizadas no estudo.

2) Local do estudo

Os procedimentos descritos acima serão realizados parte no Consultório de Dermatologia ou no Hospital Santa Casa de Misericórdia da PUCPR, (avaliação clínica e coleta sanguínea), parte nos laboratórios da PUCPR e instituições associadas (testes laboratoriais). Colaboração entre a PUCPR e outros institutos de pesquisa deverão aumentar as chances de sucesso e o impacto do estudo. Portanto, está sendo requerida sua autorização para o uso de sua amostra em estudos do vitiligo envolvendo outras instituições. Sua autorização só valerá sob a condição de se manter o desenho, objetivos e metodologia do projeto original, além da avaliação e aprovação de eventuais alterações pelo Comitê de Ética da PUCPR.

3) Permissão para estocagem

Está sendo solicitada a sua permissão para estocagem da sua amostra de DNA na PUCPR. Se assinar esse termo de consentimento, você está autorizando estocagem de longo prazo de sua amostra de DNA. Sua amostra de DNA será mantida indefinidamente. Isto significa que sua amostra não será destruída após um determinado período de tempo, mas sim será estocada pelo tempo que ela durar. Embora pequenas quantidades de sua amostra possam ser enviadas a instituições colaboradoras para análise, não haverá estocagem de amostras em outras instituições além da PUCPR. Amostras estocadas serão usadas exclusivamente para fins de pesquisa. Amostras estocadas poderão ser utilizadas para estudos adicionais de susceptibilidade ao vitiligo. Nenhuma outra doença será investigada. O uso da sua amostra estocada terá como condição uma nova avaliação e aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética pertinente.

4) Riscos Físicos para Saúde/Desconfortos

Os riscos físicos para saúde de participação neste estudo são muito pequenos e limitados ao procedimento de coleta de sangue. Durante a coleta de sangue, você poderá sentir um desconforto temporário devido à introdução da agulha. A coleta de sangue poderá resultar em uma pequena lesão que quase sempre cura-se sozinha. Em raros casos, pode ocorrer infecção localizada.

5) Tratamento e Compensação por Danos

Se você desenvolver infecção localizada devido ao procedimento de coleta de sangue, o tratamento será providenciado pela PUCPR. O custo deste tratamento será totalmente coberto pelo projeto.

6) Alternativas

Se você estiver afetado por vitiligo, acesso a procedimentos médicos para diagnóstico e tratamento da doença será providenciado mesmo que não queira participar do estudo. Portanto, se você decidir não participar, ou cessar sua participação no estudo a qualquer momento, todos os procedimentos para diagnósticos e tratamento médico serão mantidos pelo Hospital Santa Casa de Misericórdia da PUCPR e instituições colaboradoras.

Se você não estiver afetado pelo vitiligo, você está sendo convidado a participar do estudo como parte do grupo controle ou como familiar do afetado. Neste caso, sua decisão de participar ou não, ou de cessar sua participação a qualquer momento, não irá interferir de nenhuma forma nos procedimentos médicos para diagnóstico ou tratamento do vitiligo que você possa necessitar no futuro. Da mesma forma, sua decisão não irá refletir no acesso a procedimentos médicos necessários à algum familiar ou contato afetado pelo vitiligo.

7) Custos para os participantes

No caso de você decidir participar do estudo, você não terá nenhum custo. Custos com testes laboratoriais e análises de suas amostras para propósito de pesquisa serão cobertos pelo estudo.

8) Benefícios

A longo prazo, os procedimentos médicos e laboratoriais aos quais você será submetido poderão facilitar a detecção de resistência ao tratamento do vitiligo, tornando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados, com conseqüente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pelo vitiligo.

9) Reembolso

Você não será reembolsado por participar deste estudo.

10) Exclusividade do uso do material genético

Amostras de DNA SERÃO UTILIZADAS APENAS PARA PESQUISA DE SUSCEPTIBILIDADE AO VITILIGO. Nenhuma outra doença será estudada. Se, devido a situações imprevistas, os pesquisadores descobrirem alguma informação relacionada a susceptibilidades que não ao vitiligo, você será aconselhado a procurar seu médico para um exame completo. Você não terá acesso a nenhuma informação genética específica que nós produzirmos. Todos os resultados obtidos no estudo, após análise do conjunto completo dos dados, serão publicado em artigos científicos. Como estes dados publicados serão usados por outros investigadores é desconhecido. Importante reafirmar, o alvo de nossos estudos é a identificação do fator de risco genético ao vitiligo.

11) Confidenciabilidade dos dados

A participação em projetos de pesquisa pode resultar em perda de privacidade. Além disso, a descoberta de fatores de risco genéticos para vitiligo podem expor susceptibilidades de certos grupos de pessoas, possivelmente levando a outros ou certas empresas a considerar estes grupos diferentes de uma forma negativa. Entretanto, procedimentos serão adotados pelos responsáveis por este estudo no intuito de proteger a confidencialidade das informações que você fornecer e as informações produzidas pelo projeto. Nenhuma informação genética individual será tornada pública. As informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos de computador, mantidos em local restrito com acesso permitido apenas aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida.

CONSENTIMENTO

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Susceptibilidade ao vitiligo

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para mantê-lo consigo. Se você tiver qualquer dúvida no futuro sobre a sua participação neste estudo, você pode e deve utilizar os seguintes meios de contato com o pesquisador responsável:

Dr. Marcelo Távora Mira
Telefone: (41) 3271-2618
Celular: (41) 96318997
E-mail: m.mira@pucpr.br

A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTARIA

Você tem o direito de não concordar em participar ou mesmo de se retirar do estudo em qualquer momento que queira, sem riscos para o seu tratamento médico. Se você desejar e concordar em participar, deve assinar ou fornecer sua impressão digital na linha apropriada abaixo.

Se você desejar participar do estudo, permitirá que seu endereço e telefone sejam anotados em uma folha separada, para facilitar contato quando necessário. Como já foi esclarecida anteriormente, toda informação, pessoal será mantida em sigilo.

Assinatura ou impressão digital do voluntário

Nome completo e nº do prontuário

Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

Assinatura testemunha 1

Assinatura testemunha 2

____/____/____
Data

ANEXO III: MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Etapas	Ações
Preparo do material sanguíneo	<ul style="list-style-type: none"> - Coletar 5mL de sangue por punção venosa em tubos do tipo vacuotainer com EDTA; - Centrifugar o tupo de sangue por 10 minutos a 4.000 rpm; - Separar a camada leucocitária (<i>buffy coat</i>).
Lise de hemácias	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionar ao <i>buffy coat</i> o tampão de sais TKM1; - Adicionar o detergente não-aniônico Igepal; - Homogeneizar em vortex por 3 minutos; - Centrifugar por 10 minutos a 3.000rpm; - Desprezar o sobrenadante.
Lavagem	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionar TKM1; - Homogeneizar em vortex por 3 minutos; - Centrifugar por 10 minutos a 3.000rpm; - Desprezar o sobrenadante.
Lise de leucócitos e núcleo	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionar o tampão de sais TKM2; - Adicionar o detergente aniônico SDS 10%; - Homogeneizar em vortex por 3 minutos; - Incubar em banho-maria a 55°C por 24 horas.
Purificação	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionar solução de Cloreto de Sódio 6M; - Homogeneizar em vortex por 15 a 20 segundos; - Centrifugar por 15 minutos a 12.000 rpm.
Precipitação do DNA	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionar, ao sobrenadante, etanol 100%; - Transferir o DNA precipitado para um eppendorf limpo; - Adicionar etanol 70%; - Centrifugar por 10 minutos a 13.400 rpm.
Preparo do DNA para estocagem	<ul style="list-style-type: none"> - Remover o etanol 70%; - Incubar em estufa a 37°C por 2 horas; - Ressuspender o <i>pellet</i> de DNA em tampão TE; - Armazenar a -20°C.