



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

**ESTUDO DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE
SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO – ANÁLISE DE GENES
CANDIDATOS**

LILIANE MACHADO DO NASCIMENTO

Curitiba
2012

LILIANE MACHADO DO NASCIMENTO

**ESTUDO DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE
SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO – ANÁLISE DE GENES
CANDIDATOS**

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: Profº Dr. Marcelo Távora Mira

Curitiba

2012

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

N244e Nascimento, Liliane Machado
2012 Estudo de fatores de risco genéticos de suscetibilidade ao vitiligo : análise de Genes candidatos. / Liliane Machado do Nascimento ; orientador, Marcelo Távora Mira. – 2012.
115 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2012.
Bibliografia: f. 96-114

1. Vitiligo - Etiologia. 2. Genes. 3. Genética das populações. 4. Polimorfismo (Genética). I. Mira, Marcelo Távora. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.071



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

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

Aos vinte e quatro dias do mês de abril de 2012, realizou-se a sessão pública de defesa de tese "ESTUDO DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO – ANÁLISE DE GENES CANDIDATOS" apresentada por **LILIANE MACHADO DO NASCIMENTO** 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 (PUCPR) - Presidente	
Profª. Drª. Paula Cristina Trevilatto (PUCPR)	
Profª. Drª. Cynthia Chester Cardoso (UFRJ)	Cynthia C. Cardoso
Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza (UFPR)	
Prof. Dr. Sinésio Talhari (UNL)	

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: <u>Aprovada</u>
Profª. Drª. Paula Cristina Trevilatto	Conceito: <u>Aprovada</u>
Profª. Drª. Cynthia Chester Cardoso	Conceito: <u>Aprovada</u>
Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza	Conceito: <u>Aprovada</u>
Prof. Dr. Sinésio Talhari	Conceito: <u>Aprovada</u>
	Conceito Final: <u>Aprovada</u>

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

Dedico este trabalho aos meus amados pais, **Severino** e **Marilene**, pelo amor incondicional; e ao meu esposo amado **Heber**, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todas as pessoas que Ele tem colocado no meu caminho, que de uma forma ou outra têm contribuído para a minha formação não apenas acadêmica e científica, mas como ser humano.

Aos meus pais, **Severino** e **Marilene**: um muito obrigado é pouco para expressar minha gratidão a vocês por estarem sempre presentes na minha vida e sempre se doaram por inteiro me apoiando a conquistar meus sonhos. Além de vocês terem me dado a vida e ensinado a vivê-la com dignidade, vocês me deram o presente mais valioso que foi o estímulo contínuo pelos estudos e a oportunidade de poder me dedicar a ele.

Ao meu grande amor, **Heber**: um muitíssimo obrigado por fazer parte da minha vida, por compartilhar os momentos de tensão e os de alegria, por você ter sido compreensivo durante todos esses anos, sendo paciente e entendendo as minhas ausências, por você ter abdicado de finais de semana e feriados para ficar ao meu lado. Você é um exemplo de companheiro.

Ao **Dr Marcelo Távora Mira**, mais do que meu orientador, você foi e será meu mentor científico. Você é um exemplo de pesquisador em que me espelharei daqui para frente! Você terá minha eterna admiração! Obrigada pelos ensinamentos ao longo desses anos que contribuíram para a minha formação científica; obrigada pelos desafios; obrigada pela confiança, obrigada pelos “puxões de orelha” nos momentos necessários e obrigada pela paciência.

A todos os meus amigos e colegas de doutorado que muito me ensinaram e têm uma parcela importante na realização deste trabalho, com carinho agradeço:

- Em especial ao **Dr Caio Castro**. Simplesmente esse trabalho não seria o mesmo sem suas brilhantes contribuições as quais tiveram início me contagiando com sua paixão pelo Vitiligo e pela pesquisa; passando pelo recrutamento da inigualável amostra populacional do estudo, permeando a seleção dos genes estudados, compartilhando publicações e finalizando com as palavras de estímulo vindas a cada instante. Obrigada por estar presente em cada etapa do meu doutorado!
- Aos meus queridos amigos e colegas de doutorado **Dra Renata Werneck** e **Dr Vinícius Fava**, os quais compartilharam angustias e alegrias; e não poderia deixar de mencionar a colaboração na análise estatística que foi de suma importância.

- A minha amiga **Renata Helena Sindeaux**. Estivemos juntas ao longo dessa trajetória e descobri que além de uma colega de doutorado e vizinha de bancada eu tive o privilégio de desfrutar de uma verdadeira amizade.
- A **Helena Regina S. D' Espindula, Rafael Saraiva de Andrade, Vanessa Muraro**, meus sinceros agradecimento pela colaboração com o experimento de dosagem enzimática.
- Aos meus colegas que compartilharam ou ainda compartilham a vivência da Pós-Graduação: **Ângela Schneider Frâncio, Heloisa Salomão, Laire S. Ferreira, Monica Dallmann, Roberto Tarlé, Wilian C. de Macedo**.

A **Equipe do Génome Québec Innovation Centre**, Montreal – Canadá, obrigada pela receptividade e pelo apoio com os métodos laboratoriais de genotipagem.

Ao **Prof Carlos Aita**, pelo auxílio com a dosagem enzimática.

As Secretárias **Denise e Renata** pelo apoio fornecido na logística do recrutamento dos pacientes.

Ao **Laboratório Imunogenética PUCPR**: *Cristina von Glehn, Ana Luisa Ponsirenas, Renata Ponsirenas, Helena B. Cazarote e demais colaboradores*; obrigada pela compreensão e apoio durante esses anos.

A **Karina Omari**, não tenho palavras para expressar o que significou para mim o seu apoio e incentivo na reta final. Obrigada pelas palavras de conforto nos momentos difíceis e pela amizade que se inicia! Tenho certeza que nosso “Carnaval” na PUC será lembrado por muito tempo...

E não deixando de agradecer, especialmente, a **todos os pacientes portadores de vitiligo e seus parentes** que, sem restrições, concordaram em ser voluntários para a pesquisa.

EPIGRAFE

You cannot teach a man anything; you can only help him find it within himself.

Galileo Galilei (1564-1642) Italian physicist and astronomer.

A great pleasure in life is doing what people say you cannot do.

Walter Bagehot (1826-77) English economist, political journalist and critic.

Keep the subject constantly before me and wait till the first dawns open little by little into the full light.

E.N. da C. Andrade, *Sir Isaac Newton, His Life and Work*, Doubleday Anchor, New York, 1950, p. 35.

RESUMO

Estudo de Fatores de Risco Genéticos de Suscetibilidade ao Vitiligo – Análise de Genes Candidatos

O vitiligo é uma doença sistêmica crônica adquirida, de evolução clínica imprevisível, caracterizada pelo surgimento de máculas acrômicas na pele e mucosa e despigmentação de cabelos e pêlos, resultantes da ausência de melanócitos funcionantes nas áreas acometidas. A doença afeta ambos os sexos, pode manifestar-se em qualquer idade e afeta cerca de 1% da população. A etiopatogenia do vitiligo ainda é pouco conhecida, no entanto, pesquisadores sugerem que o dano ao melanócitos seria causado por um mecanismo imuno-mediado, e/ou por comprometimento mediado por metabólitos tóxicos das células. Nesse contexto, genes e variantes genéticas de suscetibilidade à doença têm sido descritos através de diferentes tipos de análises observacionais e moleculares com o intuito de elucidar o componente genético envolvido na patogênese da doença. Análise de associação baseada em família realizada com 189 famílias nucleares, procedentes do sul do Brasil, visou testar para replicação achados anteriores de associação entre vitiligo e polimorfismos dos genes *FAS*, *COMT* e *EDN1* e ainda testar pela primeira vez polimorfismos do gene *BCHE* como candidato ao controle da suscetibilidade à doença. Os marcadores dos genes acima mencionados foram genotipados utilizando a plataforma SEQUENOM MassARRAY e o sistema TaqMan de discriminação alélica. Como resultado foram observados dois sinais independentes de associação entre a doença e o gene *BCHE*, sendo o alelo “C” do SNP rs1355538 associado a um aumento do risco para vitiligo ($P = 0,006$; OR 1,90; 95% CI 1,20 – 3,02) e o alelo “A” do SNP rs1803274 associado com proteção para o vitiligo ($P = 0,03$; OR 0,70; 95% CI 0,49 – 0,98). Pelo fato da associação observada para o gene *BCHE* ter sido inédita, os SNPs rs1355538 e rs1803274 foram testados para replicação em uma amostra populacional caso-controle independente constituída de 134 indivíduos não-relacionados afetados com vitiligo e 134 indivíduos controles, pareados de acordo com idade e sexo. Associação estatisticamente significativa foi observada entre o alelo “A” do SNP rs1803274 e casos com vitiligo não-segmentar e com doenças autoimune epidemiologicamente associadas ao vitiligo ($P = 0,02$; OR 0,56; 95% CI 0,32 – 0,97). Como o marcador rs1803274 tem impacto sobre a atividade da enzima BChE, análise funcional de correlação genótipo-fenótipo foi realizada com 49 indivíduos afetados com vitiligo e foi evidenciado uma associação entre o alelo “A” rs1803274 e redução da atividade da enzima BChE ($P = 0,01$). Associação estatisticamente significativa foi observada entre vitiligo e os polimorfismos rs2243978 e rs4406738 do gene *FAS* e o polimorfismo rs933271 do gene *COMT*, replicando as evidências de associação previamente descritas para esses genes. Já a associação entre o gene *EDN1* e vitiligo não foi estatisticamente significativa na amostra populacional estudada. Em conjunto, os resultados do presente estudo implicam o gene *BCHE* como novo gene de suscetibilidade ao vitiligo e reforçam o papel dos genes *FAS* e *COMT* na patogênese da doença.

Palavras-chave: Vitiligo; Associação; Genética; Polimorfismos; *BCHE*; *FAS*; *COMT*; *EDN1*.

ABSTRACT

ANALYSIS OF GENETIC RISK FACTORS FOR VITILIGO SUSCEPTIBILITY - CANDIDATE GENES

Vitiligo is an acquired, systemic, chronic disease of unpredictable evolution, characterized by achromic macules on skin and mucosa and depigmentation of hair and fur, resulting from the absence of functioning melanocytes in the affected areas. The disease affects both genders equally, with onset at any age, and affects about 1% of the population. The pathogenesis of vitiligo is still poorly understood, however, researchers suggest that the damage to melanocytes would be caused by an immune-mediated mechanism and / or mediated by impaired cell toxic metabolites. In this context, genes and genetic variants in disease susceptibility have been described with the use of different types of observational and molecular analysis in order to elucidate the genetic component involved in the disease pathogenesis. Family-based association analysis involved 189 nuclear families from the south of Brazil and aimed at testing for replication previous findings of association between vitiligo and polymorphisms of *FAS*, *COMT* and *EDN1* genes and at testing genetic variants of the *BCHE* gene, for the first time, as a candidate for the control of disease susceptibility. Markers of the genes mentioned above were genotyped in the platform SEQUENOM MassARRAY and TaqMan allelic discrimination system. As a result two independent association signals were observed between the disease and the *BCHE* gene with allele "C" of SNP rs1355538 associated with an increased risk of vitiligo ($P = 0.006$; OR 1.90; 95% CI 1.20 – 3.02) and allele "A" of SNP rs1803274 associated with vitiligo protection ($P = 0.03$; OR 0.70; 95% CI 0.49 – 0.98). Since the association observed for *BCHE* gene is a novelty, SNPs rs1355538 and rs1803274 were tested for replication in a case-control sample population consisting of 134 independent non-related individuals affected with vitiligo and 134 controls matched according to age and gender. Statistically significant association was observed between allele "A" of SNP rs1803274 and cases with non-segmental vitiligo and autoimmune diseases epidemiologically associated with vitiligo ($P = 0.02$; OR 0.56; 95% CI 0.32 – 0.97). As the marker rs1803274 has an impact on the enzyme BChE activity, functional analysis of genotype-phenotype correlation was performed with 49 vitiligo affected cases and an association between allele "A" rs1803274 and lower BChE activity ($P = 0.01$) was shown. Statistically significant association was observed between vitiligo and polymorphisms of *FAS* gene rs2243978 and rs4406738, and *COMT* gene rs933271, replicating the previously described association evidence for these genes. The association between *EDN1* gene and vitiligo was not statistically significant in the sample population studied. Together, the results of the present study imply in the *BCHE* gene as a novel susceptibility gene to vitiligo and reinforce the role of *FAS* and *COMT* genes in the disease's pathogenesis.

Keywords: Vitiligo, Association; Genetic; Polymorphisms; *BCHE*; *FAS*; *COMT*; *EDN1*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Descrição dos antígenos HLA associados ao vitiligo em diferentes grupos étnicos.....	35
Quadro 2: Genes e marcadores candidatos.	58
Figura 1: Desenho geral do estudo	52
Figura 2: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene <i>BCHE</i> . Os números no interior dos quadrados indicam a proporção de DL, em %, calculado utilizando-se o parâmetro r^2 ; o código de cores reflete a intensidade de DL entre dois <i>loci</i> : quanto mais escuro o quadrado, maior o DL entre os SNPs.....	64
Figura 3: Atividade da enzima BChE de acordo com genótipos do rs1803274.....	69
Figura 4: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene <i>FAS</i> . Os números no interior dos quadrados indicam a proporção de DL, em %, calculado utilizando-se o parâmetro r^2 ; o código de cores reflete a intensidade de DL entre dois <i>loci</i> : quanto mais escuro o quadrado, maior o DL entre os SNPs.....	70
Figura 5: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene <i>COMT</i> . O número no interior do quadrado indica a proporção de DL, em %, calculado utilizando o parâmetro r^2 ; o código de cores reflete a intensidade de DL entre dois <i>loci</i> : quanto mais escuro o quadrado, maior o DL entre os SNPs.	73
Figura 6: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene <i>EDN1</i> . Os números no interior dos quadrados indicam a proporção de DL, em %, calculado utilizando-se o parâmetro r^2 ; o código de cores reflete a intensidade de DL entre dois <i>loci</i> : quanto mais escuro o quadrado, maior o DL entre os SNPs.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos genético de ligação em Vitiligo	24
Tabela 2: Genes Não-HLA investigados por estudos de associação em vitiligo	26
Tabela 3: Características demográficas e clínicas dos indivíduos selecionados para estudo funcional	55
Tabela 4: Análise de associação baseada em famílias entre o gene <i>BCHE</i> e vitiligo	65
Tabela 5: Haplótipo entre os alelos dos marcadores do gene <i>BCHE</i> associados ao vitiligo	66
Tabela 6: Influência de variáveis não-genéticas sobre a associação entre polimorfismos do gene <i>BCHE</i> e vitiligo	67
Tabela 7: Análise de associação caso-controle entre o gene <i>BCHE</i> e vitiligo	68
Tabela 8: Análise de associação dos SNPs do gene <i>FAS</i> e vitiligo.....	71
Tabela 9: Haplótipos entre os alelos dos marcadores associados do gene <i>FAS</i>	71
Tabela 10: Influência de variáveis não-genéticas sobre a associação entre polimorfismos do gene <i>FAS</i> e vitiligo.....	72
Tabela 11: Análise de associação dos SNPs do gene <i>COMT</i> e vitiligo	74
Tabela 12: Influência de variáveis não-genéticas sobre a associação entre polimorfismos do gene <i>COMT</i> e vitiligo.....	75
Tabela 13: Análise de Associação dos SNPs do gene <i>EDN1</i> com vitiligo.....	77

LISTA DE ABREVIATURA

- λ_r - Risco Relativo
- λ_s – Risco relativo entre irmãos
- λ_p – Risco relativo entre pais
- Θ - Fração de Recombinação
- a.C.** – antes de Cristo
- ACE** – em inglês, *Angiotensin I Converting Enzyme gene*
- AChE** – Acetilcolinesterase
- AIRE** – em inglês, *Autoimmune Regulator gene*
- AIS1** – em inglês, *Autoimmunity Susceptibility Locus 1*
- ASC** - Análise de segregação complexa
- ASIP** – em inglês, *Agouti Signaling Protein*
- BChE** – Enzima Butirilcolinesterase
- BCHE** – gene que codifica a enzima Butirilcolinesterase
- bFGF** - em inglês, *Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6 gene*
- BH4** – Tetrahidrobiopterina
- BTNL2** – em inglês, *Butyrophilin-like 2 (MHC class II associated) gene*
- C1QTNF6** – em inglês, *C1q and tumor necrosis factor related protein 6 gene*
- C6orf10** – em inglês, *Chromosome 6 open reading frame 10 gene*
- CAT** – em inglês, *Catalase gene*
- CCN3** – em inglês, *Nephroblastoma overexpressed gene*
- CCR6** – em inglês, *Chemokine receptor 6 gene*
- CCR5** – em inglês, *Chemokine receptor 5 gene*
- CD4** – em inglês, *CD4 molecule gene*
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
- CEU** - População com ascendência Européia
- CHB** - População com ascendência Chinesa
- CI** – Intervalo de Confiança
- CLA⁺** - em inglês, *Cutaneous lymphocyte antigen*
- COMT** – em inglês, *Catechol-O-Methyltransferase gene*
- CoQ₁₀H₂** – Coenzima Q10
- COX2 (PTGS2)** – em inglês, *prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene*
- CNV** – Variação no número de cópias
- CTLA-4** – em inglês, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 gene*
- DD** - em inglês, *Death Domain*
- DDR1** – em inglês, *Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1 gene*

DISC - em inglês, *Death-inducing signaling complex*

DL - Desequilíbrio de Ligação

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

DTNB - Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico

DZ – Gêmeos dizigóticos

EDN1 – em inglês, *Endothelin 1 gene*

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

ESR1 – em inglês, *Estrogen receptor 1*

ETs – Endotelinas

EUA – Estados Unidos da América

FADD – em inglês, *Fas associated DD* - domínio de morte associada à Fas

FAM – Frequência Alélica Mínima

FAMTM – Sonda marcada com fluoróforo denominado FAMTM

FAS – em inglês, *TNF receptor superfamily member 6 gene*

FasL – Fas ligante

FASLG – em inglês, *FAS ligand gene*

FBAT – Teste de Associação Baseado em Família

FBXO11 (VIT1) – em inglês, *F-box protein 11 gene*

FGFR1OP – em inglês, *FGFR1 oncogene partner*

FOXD3 – em inglês, *Forkhead box D3*

FOXP1 – em inglês, *Forkhead box P1*

FOXP3 – em inglês, *Forkhead box P3*

Gld - Doença linfoproliferativa generalizada

GPX1 – em inglês, *Glutathione peroxidase 1 gene*

GSTM1 – em inglês, *Glutathione S-transferase mu 1 gene*

GSTP1 – em inglês, *Glutathione S-transferase pi 1 gene*

GSTT1 – em inglês, *Glutathione S-transferase theta 1 gene*

GZMB – em inglês, *Granzyme B*

GWAS – em inglês, *Genome Wide Association Study*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HGF – em inglês, *Hepatocyte growth factor gene*

HLA – Antígenos Leucocitário Humano

HWE - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

IBD - Idênticos por descendência

ICA1 – em inglês, *Islet cell autoantigen 1*

IDDM8 – em inglês, *Insulin-dependent diabetes mellitus 8*

IFN α – Interferon Alfa

IL – Interleucina

IFNG – em inglês, *Interferon gama*

IL2RA – em inglês, *Interleukin 2 receptor alpha gene*

IMC - Índice de massa corporal

JPT - População com ascendência Japonesa

kDa - KiloDalton

LES – Lupus Eritematoso Sistêmico

LOD – Logaritmo das odds de ligação

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

Lpr - Linfoproliferação

LTA – em inglês, *Lymphotoxin Alpha gene*

MAO-A - Monoaminoxidase

MBL2 – em inglês, *Mannose binding lectin gene*

MC1R – em inglês, *melanocortin 1 receptor gene*

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MITF - em inglês, *Microphthalmia - Associated Transcription Factor*

MPO – em inglês, *Myeloperoxidase gene*

MYG1 (*C12orf10*) – em inglês, *chromosome 12 open reading frame 10 gene*

MYH15 – em inglês, *Myosin, heavy chain 15 gene*

MZ – Gêmeos Monozigóticos

NLRP1 – em inglês, *NACHT leucine-rich repeat protein 1 gene*

Nrf2 – em inglês, *NF-E2 related factor 2 gene*

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

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Pmel17 - Proteína da Matrix Melanossomal

PRO2268 – em inglês, *Hypothetical protein PRO2268 gene*

PDGFRA – em inglês, *Platelet-derived growth factor receptor gene*

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

PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

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

RNASET2 – em inglês, *Ribonuclease T2 gene*

RR – Risco Relativo

rs – em inglês, *reference SNP number*

SAM – grupo S-adenosil-metionina

SAP – em inglês, *Shrimp Alkaline Phosphatase*

SBE.- em inglês, *Single base extension*

SCGF (*CLEC11A*) – em inglês, *C-type Lectin domain family 11, member A gene*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SH2B3 – em inglês, *SH2B adaptor protein 3 gene*

SLEV1 – nome do *locus* na região 17p13

SMOC2 – em inglês, *SPARC related modular calcium binding 2*

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo de base única

SOX10 – Fator de Transcrição

SP1 - Proteína estimuladora 1

STAT1 - Ativador de transcrição de proteína 1

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

STRPs - em inglês, *Short Tandem Repeat Polymorphisms*

TAP – gene codifica Proteína de processamento de antígeno com transportador associado.

TBC1D2 – em inglês, *TBC1 domain family, member 2 gene*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDT – Teste de Desequilíbrio de Transmissão

TGF-β – em inglês, *Transforming growth factor-beta*

TGFBR2 – em inglês, *Transforming growth factor, beta receptor II gene*

Th1 – Linfócitos T auxiliares 1

TKM – Tampão Tris-KCl-MgCl₂

– Gene que codifica a citocina TNFα

TNFα – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRP – Proteína relacionada à tirosinase

TNFA – em inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha gene*

TSLP – em inglês, *Thymic stromal lymphopoietin gene*

TYR – em inglês, *Tyrosinase gene*

TXNDC5 – em inglês, *Thioredoxin domain containing 5 gene*

U – Unidades

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

UVA – Raios Ultravioletas A

UVB – Raios Ultravioletas B

UVRAG – em inglês, *UV radiation resistance associated gene*

VDR – em inglês, *Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor gene*

VETF - *Vitiligo European Task Force*

VIC™ – Sonda marcada com fluoróforo denominado VIC™

Vit E – Vitamina E

XBP1 – em inglês, *X-box binding protein 1 gene*

YRI - Populações com ascendência Africana

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA GERAL DO VITILIGO.....	1
1.2. CONTEXTO HISTÓRICO DO VITILIGO	3
1.3. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DO VITILIGO.....	4
1.4. FISIOPATOLOGIA DO VITILIGO.....	6
1.4.1. Teoria Autoimune	6
1.4.2. Teoria Bioquímica	8
1.4.3. Outras Teorias.....	10
1.5. GENÉTICA HUMANA DE DOENÇAS COMPLEXAS.....	11
1.5.1. Estudos de Genética Epidemiológica Observacional	11
1.5.2. Estudos de Ligação	13
1.5.3. Estudos de Associação	14
1.5.4. Desequilíbrio de Ligação	17
1.6. GENÉTICA DA SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO	19
1.6.1. Vitiligo: Uma Doença Complexa?.....	19
1.6.2. Genética Epidemiológica Observacional em Vitiligo	20
1.6.3. Estudos de Ligação em Vitiligo	21
1.6.4. Estudos de Associação em Vitiligo.....	25
1.6.4.1. Genes Não-HLA	25
1.6.4.2. Genes <i>HLA</i>	35
1.6.4.3. <i>Genome Wide Associations Study</i> (GWAS).....	36
1.7. GENES CANDIDATOS	40
1.7.1. Butirilcolinesterase (<i>BCHE</i>).....	40
1.7.2. Genes de Interesse para Replicação	42
1.7.2.1. <i>TNF receptor superfamily, member 6</i> (<i>FAS</i>).....	42
1.7.2.2. Catecol-O-Metiltransferase (<i>COMT</i>).....	44
1.7.2.3. Endotelina-1 (<i>EDN1</i>)	46
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	48
3. OBJETIVOS	49

3.1. OBJETIVO GERAL	49
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. MÉTODOS	51
4.1. DESENHO GERAL DO ESTUDO	51
4.2. AMOSTRA POPULACIONAL PARA O ESTUDO GENÉTICO.....	51
4.2.1. Amostra Populacional de Famílias	53
4.2.2. Amostra Populacional Caso-controle	53
4.2.3. Critérios de Inclusão.....	54
4.2.4. Critérios de Exclusão.....	54
4.3. AMOSTRA POPULACIONAL PARA O ESTUDO FUNCIONAL.....	54
4.4. COLETA DO MATERIAL, EXTRAÇÃO DO DNA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS	56
4.5. SELEÇÃO DOS GENES E MARCADORES CANDIDATOS.....	57
4.6. ANÁLISE MOLECULAR.....	58
4.6.1. Análise Molecular - Genotipagem na Plataforma de Alto Rendimento Sequenom®	59
4.6.2. Genotipagem Através do Sistema de Discriminação Alélica	60
4.7. DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BCHE.....	61
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5. RESULTADOS.....	63
5.1. BUTIRILCOLINESTERASE (<i>BCHE</i>)	63
5.1.1. Análise de Associação Baseada em Famílias do Gene <i>BCHE</i> com Vitiligo	63
5.1.2. Análise Haplotípica dos Marcadores do Gene <i>BCHE</i>	65
5.1.3. Influência das Variáveis Não-Genéticas Sobre a Associação entre Polimorfismos do Gene <i>BCHE</i> e Vitiligo.....	66
5.1.4. Análise de Associação Caso-Controle do Gene <i>BCHE</i> com Vitiligo – Experimento de Replicação.....	67
5.1.5. Análise Funcional de Correlação Genótipo-Fenótipo	68
5.2. <i>TNF RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 6 (FAS)</i>	69
5.2.1. Análise de Associação do Gene <i>FAS</i> com Vitiligo.....	69
5.2.2. Análise Haplotípica entre os Marcadores do Gene <i>FAS</i>	71

5.2.3. Influência das Variáveis Não-Genéticas sobre a Associação entre Polimorfismos do Gene <i>FAS</i> e Vitiligo.....	72
5.3. CATECOL-O-METILTRANSFERASE (<i>COMT</i>)	73
5.3.1. Análise de Associação do Gene <i>COMT</i> com Vitiligo.....	73
5.3.2. Influência de Variáveis Não-Genéticas sobre a Associação entre Polimorfismos do Gene <i>COMT</i> e Vitiligo	74
5.4. <i>ENDOTELINA -1 (EDN1)</i>	75
6. DISCUSSÃO	78
6.1. ESTUDOS GENÉTICOS – PODER E LIMITAÇÕES	78
6.2. ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO COM GENE CANDIDATO INÉDITO	80
6.2.1. <i>BCHE</i>	81
6.3. GENES DE INTERESSE PARA REPLICAÇÃO.....	85
6.3.1. <i>FAS</i> e <i>COMT</i>	87
6.3.2. <i>EDN1</i>	91
6.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
7. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXO.....	115
ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Estudo Genético	
ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Estudo Funcional	
ANEXO 3 - Aprovação do Estudo pelo CEP	
ANEXO 4 - Questionário para Coleta de Sangue para dosagem da atividade da enzima BChE	
ANEXO 5 - Artigo: " <i>Genetic Variants of the DDR1 Gene Are Associated with Vitiligo in Two Independent Brazilian Population Samples</i> "	
ANEXO 6 - Artigo: " <i>A pattern of association between clinical form of vitiligo and disease-related variables in a Brazilian population</i> "	

1. INTRODUÇÃO

1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA GERAL DO VITILIGO

O vitiligo está entre as doenças pigmentares mais frequentes. É uma doença crônica, adquirida, não contagiosa, caracterizada pelo surgimento progressivo de máculas desprovidas de pigmentação em áreas da pele e mucosa, e despigmentação de cabelos e pêlos, resultantes da perda de melanócitos nas áreas envolvidas (1, 2). As manchas acrômicas apresentam diferentes tamanhos, formas e simetria, de acordo com o tipo de vitiligo, com bordas delimitadas, raramente eritematosas ou hiperacrômicas.

A doença afeta igualmente ambos os sexos (3-6) e não existe diferença nas taxas de ocorrência do vitiligo de acordo com o tipo de pele (7). Além disso, o vitiligo pode manifestar-se em qualquer idade, sendo a média de idade de início os 25 anos, (4, 8-10) podendo ser variável em diferentes regiões geográficas (5, 11). Além disso, diferenças na média de idade de início do vitiligo têm sido relatadas entre casos de vitiligo familiar e esporádico (11, 12).

A prevalência do vitiligo na população mundial é de aproximadamente 0,5% (13), sendo estimada em 0,19% na China (11), 0,38% na Dinamarca (7), 1% no EUA (14) e 1,13% na Índia (6). As taxas de prevalência variam de acordo com a região geográfica e grupos étnicos envolvidos. O Brasil não possui dados epidemiológicos atualizados relativos à incidência e prevalência da doença.

Estudo relata que 30% de pacientes caucasianos com vitiligo generalizado são afetados por pelo menos uma doença autoimune adicional. Descrição de uma população composta por 1802 pacientes com vitiligo com idade \geq 20 anos, recrutados nos Estados Unidos e Reino Unido, revelou que 19,4% dos indivíduos caucasianos adultos com a doença apresentavam também algum tipo de doença da tireóide. Anemia perniciosa foi observada em 1,9% dos adultos afetados com vitiligo. Já a doença de Addison, o Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) e a doença de Crohn são menos comuns, porém ocorreram em uma frequência aumentada nos indivíduos com vitiligo (10). No entanto, em chineses, as doenças autoimunes associadas ao

vitiligo, bem como suas proporções, apresentaram uma variação quando comparados aos caucasianos. Em um estudo envolvendo 6.199 pacientes de origem chinesa afetados com vitiligo, somente 7,7% apresentaram pelo menos uma doença autoimune associada ao vitiligo, sendo que a doença de maior prevalência foi artrite reumatóide (2,2%), seguida pela alopecia areata (0,89%), urticária crônica (0,86%) e psoríase (0,34%). Nessa população, não foi observado aumento na prevalência de doenças da tireóide, diabetes e LES, quando comparado com a prevalência dessas doenças na população geral (11).

Os fatores que desencadeiam o vitiligo são desconhecidos; no entanto, muitos pacientes afetados atribuem o início e até mesmo a progressão da doença a eventos específicos que ocorreram em suas vidas, principalmente estresse. Em um estudo realizado com 1315 pacientes com vitiligo, 324 (24,6%) apresentaram uma multiplicidade de eventos que possivelmente poderiam desencadear a doença. Entre eles, 44,1% dos pacientes desenvolveram lesões de vitiligo no local de traumatismo, como um corte ou abrasão, evento esse conhecido como fenômeno de Koebner; 26,2% desenvolveram vitiligo após tensão emocional; 11,7% após queimadura de sol e 2,8% após gestação (15). É importante mencionar que esses eventos são comuns, o que torna difícil comprovar que eles estejam realmente envolvidos no desencadeamento da doença.

Uma das principais consequências da doença não é fisiológica, mas sim, psicológica: as lesões de pele, principalmente em áreas visíveis do corpo e entre os grupos com pele mais pigmentada, podem gerar grande impacto sobre a autoestima dos pacientes, levando a um aumento dos casos de depressão grave e um forte sentimento de discriminação social (16), com consequente diminuição da qualidade de vida (17-19). Além disso, como existem melanócitos na retina e ouvido interno, podem também ocorrer anormalidades oculares, sendo uveíte a mais frequente, ou mesmo perda auditiva neuro-sensorial, conforme detectado em 13 a 16% dos pacientes (20). Seria esperado observar uma maior incidência de câncer de pele não-melanoma entre os indivíduos afetados por vitiligo, devido ao fato desses pacientes não apresentarem produção de melanina nas áreas afetadas, levando a uma menor proteção da pele contra a radiação ultravioleta. Este efeito ainda se somaria ao da radiação UVA (Psoralen + UVA) utilizada no tratamento da doença.

No entanto, estudos têm demonstrado o oposto (21-23). Nesse contexto, é possível especular que existam mecanismos de proteção na pele desses pacientes com vitiligo que estariam envolvidos na prevenção ao câncer. Um dos possíveis mecanismos foi reportado por Schallreuter e cols., e estaria relacionado a superexpressão da proteína p53 no vitiligo, que teria um efeito anticarcinogênico (24). Além disso, alguns estudos demonstraram que pacientes com vitiligo apresentam um aumento dos níveis de superóxido dismutase e glutathione peroxidase (25), ambos associados a um efeito protetor contra dano oxidativo. Ainda, observam-se nos pacientes com vitiligo uma superexpressão de citocinas pró-inflamatória IL-1 e TNF- α , as quais estimulam a produção de superóxido dismutase. Esses fatores, juntamente com os baixos níveis da citocina procarcinogênica TGF- β presentes nos pacientes com vitiligo, possivelmente contribuem para um menor risco de câncer nesses pacientes (26).

1.2. CONTEXTO HISTÓRICO DO VITILIGO

Etimologicamente, a palavra vitiligo é derivada do latim “*vitulum*” ou “*vitium*” que significa falta, defeito ou mancha. O vitiligo foi descrito há séculos, com referências em escritos como o Papiro de Ebers, no Egito e o Livro Sagrado Atharva Veda, na Índia, que datam em torno de 1.500 a.C. Existem várias referências na Bíblia, no antigo testamento, principalmente em Levítico 13, ao termo *Zoráat* ou *Tzaraat*, que em hebreu clássico significa “manchas brancas”. No entanto, é provável que antigamente a menção a manchas brancas na pele não representavam somente *vitiligo*, mas também outras doenças tais como hanseníase, psoríase e outras leucodermias (27, 28).

Foi somente no século XIX que o termo vitiligo começou a ser usado especificamente para a doença adquirida progressiva, caracterizada pela destruição de melanócitos na pele. Nessa época, em Viena, Moritz Kaposi foi um dos primeiros a descrever a histopatologia do vitiligo, observando a ausência de pigmento nas células da camada basal da epiderme (29).

1.3. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DO VITILIGO

Para o diagnóstico do vitiligo, os indivíduos são submetidos a uma avaliação clínica, na qual é investigada a extensão da doença, o nível de despigmentação (total ou parcial), simetria entre as lesões e comprometimento de mucosa (30). Além disso, é averiguada a existência de história familiar de vitiligo, aparecimento precoce de cabelos grisalhos, presença ou história familiar de doença da tireóide ou outras doenças autoimune epidemiologicamente associada ao vitiligo (13). Uma avaliação de todo o tegumento através do exame com lâmpada de Wood, que emite luz ultravioleta “A” em ambiente escuro, fornece uma informação adicional da extensão e atividade das lesões do vitiligo (31): o objetivo é de diferenciar acromia (ausência de pigmento), encontrada no vitiligo, de hipocromia (pequena quantidade de pigmento) encontrada em outras doenças. Diagnóstico diferencial deve ser realizado entre vitiligo e doenças de pele despigmentantes ou hipopigmentantes, tais como, halo nevus, hanseníase, psoríase, dermatite atópica, micose fungoide associadas à despigmentação e outras leucodermias. Três doenças principais - piebaldismo, ptíriase versicolor e hipomelanose idiopática - podem ser confundidas com o vitiligo (31). Em raros casos é necessário realizar uma biópsia para confirmação do diagnóstico (13).

Vários autores concordam em classificar o vitiligo em “segmentar” e “não-segmentar”, um critério simplificado que considera a ocorrência ou não de lesões em dermatômos (região da pele inervada por ramificação nervosa específica), e pressupõem origens e características clínicas distintas para estes dois grupos (31-33). Ambas as formas podem iniciar como vitiligo focal, caracterizado por uma pequena área afetada ($< 15 \text{ cm}^2$) (34). Em raros casos, o vitiligo não-segmentar e segmentar coexistem, e em tais casos, lesões segmentar são menos responsivas ao tratamento (35).

O vitiligo segmentar acomete geralmente jovens, e é responsável por 30% dos casos em crianças (13). Estudo realizado com 586 indivíduos afetados com vitiligo oriundos do sul do Brasil, com nossa participação, demonstrou um gradiente de distribuição de idade de início do vitiligo entre as formas clínicas segmentar, vulgar e acrofacial, sendo que os indivíduos com vitiligo segmentar apresentaram a

média mais baixa de idade de início de doença (16 anos) quando comparados aos indivíduos com as outras formas da doença (36). O vitiligo segmentar apresenta interrupção da progressão das lesões após um ano, bem como tem menor associação com doenças autoimune (32, 33, 37). A forma segmentar é caracterizada clinicamente por distribuição unilateral, assimétrica e dermatomal das manchas, acometendo um ou mais dermatômos (32). As máculas no vitiligo segmentar geralmente apresentam as bordas irregulares, com perda de pigmentação menos homogênea do que no vitiligo não-segmentar (34). A proporção do total de pacientes portadores de vitiligo afetados pela forma segmentar apresenta grande variação interétnica (33, 38). História familiar da doença foi reportada em 11,5% dos pacientes afetados por vitiligo segmentar (32, 36).

O vitiligo não-segmentar é a forma mais comum da doença (85 – 90% dos casos gerais), inicia-se a qualquer idade, e sem tratamento podem surgir novas lesões ao longo da vida do indivíduo. Apresenta características que ligam a sua patogênese a mecanismos de controle de autoimunidade, como uma maior frequência de associação com doenças autoimune (39). Pacientes com esta forma clínica frequentemente apresentam fenômeno de Koebner (33, 36). A forma não-segmentar é caracterizada clinicamente por uma distribuição bilateral e simétrica das máculas, as quais variam de tamanho com o tempo. As máculas no vitiligo não-segmentar tipicamente apresentam uma despigmentação homogênea e têm as bordas bem definida (34). Neste tipo de vitiligo, frequentemente observa-se agregação familiar de casos, o que sugere a existência de um componente genético no controle da manifestação da doença (39).

Além da classificação do vitiligo em segmentar e não-segmentar, autores propõem que os indivíduos afetados por vitiligo não-segmentar podem ser classificados em diferentes subtipos clínicos (40), conforme descrito abaixo:

- Vitiligo Focal - uma ou poucas máculas isoladas em determinada área da pele em uma distribuição não-dermatomal. Estas máculas são limitadas em tamanho e número;
- Vitiligo Acrofacial - máculas limitadas às extremidades distais de mãos e pés, face e região genital (área perifacial), há pelo menos um ano;

- Vitiligo Vulgar – manchas brancas afetando as mesmas áreas afetadas pelo tipo acrofacial e também, tórax, abdômen, pescoço, nádegas, axilas, membros superiores e inferiores, simetricamente distribuídas;
- Vitiligo Universal - todo ou quase todo o tegumento acometido por despigmentação.

O *Vitiligo European Task Force* (VETF) propôs a classificação do vitiligo em generalizado e localizado, considerando o número de lesões e sítios anatômicos afetados. Segundo VETF, o vitiligo generalizado abrange as formas acrofacial, vulgar e universal e o vitiligo localizado pode ser subdividido em segmentar e focal. No entanto, ao longo do tempo o vitiligo que foi classificado inicialmente como focal ou acrofacial pode progredir para o vitiligo classificado como segmentar e generalizado (34).

1.4. FISIOPATOLOGIA DO VITILIGO

O mecanismo que leva à perda dos melanócitos ainda não está totalmente esclarecido, o que torna essa doença de interesse para pesquisadores de diversas áreas. Existem três principais teorias para a patogênese do vitiligo: a autoimune, a da disfunção neural e a autocitotóxica. Segundo Dell`Anna e cols., a fisiopatologia do vitiligo pode ser dividida em dois grandes pólos, um que corresponde à idéia de um dano ao melanócito causado por um mecanismo imunomediado, e outro, que considera que o dano ao melanócito seria devido a um comprometimento mediado por metabólitos tóxicos das células (41). Embora, as hipóteses propostas sejam plausíveis, nenhuma delas, por si só, explica integralmente a causa da doença.

1.4.1. Teoria Autoimune

A hipótese autoimune é hoje a mais aceita entre os especialistas (42), e foi inicialmente proposta com base na frequente coocorrência de doenças autoimune em pacientes afetados por vitiligo e seus familiares (39), provavelmente devido a mecanismos imunológicos e fatores genéticos comuns ainda desconhecidos

compartilhados entre elas. Outra evidência a favor da hipótese autoimune é a repigmentação da pele como resultado positivo do uso de terapias com imunomoduladores tópicos que atuam na ativação e maturação de células T em lesões vitiliginosas, levando a subsequente inibição da produção de várias citocinas (43). Além disso, Hann e cols. demonstraram uma diminuição da citotoxicidade mediada por anticorpos contra melanócitos após tratamento com esteróide sistêmico em pacientes com vitiligo (44).

No entanto, o argumento mais convincente a favor da teoria autoimune do vitiligo é a presença de autoanticorpos contra antígenos de superfície e citoplasmáticos das células pigmentares no soro de pacientes com vitiligo, detectados por diferentes técnicas. Dentre os antígenos alvos reconhecidos pelos autoanticorpos presentes nos paciente com vitiligo, destacam-se a Tirosinase e as proteínas 1 e 2 relacionadas à Tirosinase (TRP-1 e TRP-2), enzimas chave envolvidas na síntese da melanina. Além desses, foram detectados anticorpos contra proteínas de 35 e 90 kDa expressas principalmente pelas células pigmentares, proteína da matriz melanossomal gp100 (Pmel17), e o fator de transcrição SOX10. Porém, diferentes taxas de detecção para alguns desses autoanticorpos foram encontradas entre grupos de pacientes com vitiligo (45), possivelmente devido aos diversos tipos de ensaios utilizados e, ainda, devido às diferenças na resposta dos pacientes ao tratamento. Caracterização desses anticorpos demonstraram que eles pertencem a classe IgG. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que esses anticorpos presentes no soro de pacientes com vitiligo são capazes de destruir os melanócitos (46-48). A presença e os níveis desses anticorpos contra as células pigmentares foram correlacionados com a atividade e extensão da doença (49, 50). No entanto, o papel dos anticorpos antimelanócitos no vitiligo ainda permanece desconhecido.

A descoberta de infiltrado celular perilesional no vitiligo corroborou a favor da hipótese de participação da imunidade celular na patogênese da doença. Imunohistoquímica realizada em biópsia de 10 pacientes com vitiligo generalizado mostrou a presença de um infiltrado celular consistente, com predominante aumento de células T CD8⁺ e células T expressando CLA⁺ (do inglês, *cutaneous lymphocyte antigen*) na área perilesional do vitiligo, bem como aumento no número de

macrófagos quando comparado com biópsia das áreas da pele lesional e não-lesional. Também foi observado aumento da expressão de moléculas HLA-DR (HLA, Antígeno Leucocitário Humano) pelos melanócitos na área perilesional (51). Melanócitos são capazes de processar e apresentar antígenos HLA classe II, sendo que a expressão de HLA-DR pelos melanócitos contribui para que eles se tornem alvos das células T citotóxicas, o que poderia contribuir para a destruição dos melanócitos no vitiligo (52). Ogg e cols. detectaram alta frequência de células T CD8⁺ específica Melan-A no sangue periférico de 7 de 9 pacientes com vitiligo, e foi possível correlacionar esse achado com a atividade e extensão da doença (53). Mais recentemente, foi demonstrado que linfócitos T citotóxicos infiltrados em área perilesional de vitiligo generalizado destruíram os melanócitos vizinhos (54). Ainda, granzima-B e perforina imunoreativas foram detectadas na área perilesional do vitiligo, demonstrando um potencial citotóxico das células T na destruição dos melanócitos (51).

1.4.2. Teoria Bioquímica

Outra hipótese sobre a patogênese do vitiligo que tem sido amplamente investigada é a do estresse oxidativo epidérmico, baseada em evidências obtidas *in vivo* e *in vitro* (55). Foi demonstrado que os melanócitos das bordas das lesões de pacientes com vitiligo apresentavam aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo quando cultivados (56). Estudos têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio, tal como H₂O₂, podem afetar profundamente o balanço redox da epiderme; ainda, foi encontrado *in vivo* que pacientes com vitiligo podem acumular uma concentração acima de 10⁻³ M de H₂O₂ na sua epiderme (57). Além disso, tem sido demonstrado que níveis aumentados de peróxido de hidrogênio têm efeitos citotóxicos nos melanócitos (58). Diferentes possíveis fontes endógenas de produção de H₂O₂ na epiderme de pacientes com vitiligo têm sido descritas (59), incluindo aumento na atividade da Monoamino Oxidase A (MAO-A) (60), aumento da atividade da NADPH-oxidase (61) e desequilíbrio na síntese/reciclagem/regulação da (6R)-L-eritro-5,6,7,8 tetrahydrobiopterina (6-BH₄) (62).

Na pele normal, a L-tirosina é o substrato comum para a biosíntese de melanina pelos melanócitos e biosíntese de catecolaminas pelos queratinócitos. A produção de L-tirosina a partir da L-fenilalanina, catalisada pela enzima fenilalanina hidroxilase, é controlada pelo cofator 6-BH₄, que é reciclado a 4a-OH-BH₄ pela enzima 4a-hidroxi-BH₄ desidratase. Em pacientes com vitiligo, sugere-se que a atividade da enzima 4a-hidroxi-BH₄ desidratase é baixa, resultando em acúmulo de 6- e 7-BH₄ e H₂O₂ na epiderme. Uma das possíveis consequências do acúmulo de 6- e 7-BH₄ é a inibição da enzima fenilalanina hidroxilase, levando a baixo nível de tirosina e, conseqüentemente, defeito na síntese da melanina (42, 63). O acúmulo de 6- e 7-BH₄ são detectáveis clinicamente no exame com a lâmpada de Wood, por fluorescência característica verde-amarela ou azulada (40). Este cenário favorece a situação ideal para ativação da enzima tirosina hidroxilase em associação com aumento da síntese de catecolaminas, o que é confirmado pela significativa elevação dos níveis de norepinefrina na pele e plasma de pacientes com vitiligo. Além disso, foram reportados elevados níveis de metabólitos de catecolaminas na urina de pacientes com vitiligo, na fase ativa da doença, quando comparados com controles pareados por idade (64).

Outra evidência do envolvimento do estresse oxidativo na patogênese do vitiligo é a suspensão do processo de despigmentação e restauração da cor da pele com a remoção do H₂O₂ da epiderme pelo *Narrow-Band* UVB_{311nm}-pseudocatalase ativada (61, 65).

O envolvimento generalizado da epiderme também tem sido demonstrado pela capacidade do H₂O₂ em induzir a oxidação dos resíduos Trp⁴³², Trp⁴³⁵, e da Met⁴³⁶ da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual, uma vez inativada, participa em promover e manter o estresse oxidativo (59). Interessantemente, foi verificado que a atividade da AChE é baixa nas lesões de pele de vitiligo durante a despigmentação, mas retorna ao normal quando a pele lesionada volta a repigmentar (65). De importância para o presente estudo, foi demonstrado que redução da atividade da enzima butirilcolinesterase BChE em pacientes com vitiligo ativo também é influenciada pela concentração de H₂O₂ (58).

Finalmente, significativa diminuição nos níveis da catalase e dos antioxidantes não-enzimáticos (Vit E, CoQ₁₀H₂, GSH) foi observada na epiderme dos pacientes

com vitiligo quando comparados com controles (66), sugerindo indução de estresse oxidativo na epiderme afetada por vitiligo por depleção dos níveis de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.

1.4.3. Outras Teorias

Além do exposto acima, discute-se ainda uma hipótese neural para a origem do vitiligo, baseada em observações como a distribuição dermatomal da doença segmentar e a origem embriológica comum dos melanócitos e do sistema nervoso, ambos derivados da crista neural (67). Tem sido sugerido que compostos melanotóxicos liberados na extremidade do nervo periférico poderiam causar dano aos melanócitos e, conseqüentemente, diminuição na produção de melanina (68).

Recentemente, vários investigadores têm proposto a hipótese de o vitiligo ser causado por desequilíbrio no controle da morte de melanócitos por apoptose (69-71). Em contraste, foi demonstrado que a suscetibilidade relativa à apoptose em melanócitos de áreas de vitiligo é comparável com aquela de células normais, controladas homeostaticamente por moléculas regulatórias de apoptose (51).

Finalmente, outra teoria discute a possibilidade de defeitos de adesão celular estarem envolvidos na perda de melanócitos no vitiligo (72). Pacientes com vitiligo generalizado apresentaram destacamento dos melanócitos após fricção mecânica da pele não afetada (35). Esta observação levou à suposição de que o vitiligo não-segmentar é uma alteração primária melanocitorrágica, com resposta alterada do melanócito a fricção e a possíveis outros tipos de estresse, que induziriam o destacamento das células e subsequente perda trans-epidérmica. Interessantemente, Silva de Castro, Do Nascimento e cols. identificaram, em estudo baseado em famílias, com nossa participação, associação entre vitiligo e polimorfismos no gene *DDR1* (73), que codifica o receptor transmembrana de tirosina quinase, que pode levar à alteração da adesão dos melanócitos à membrana basal via integrina CCN3, já que o *DDR1* atua como receptor de colágeno IV (74).

1.5. GENÉTICA HUMANA DE DOENÇAS COMPLEXAS

O termo característica complexa refere-se a qualquer fenótipo que não exibe um padrão de herança mendeliano clássico: para estas características, não existe uma relação perfeita entre genótipo e fenótipo, pois o mesmo genótipo pode resultar em diferentes fenótipos (devido a fatores ambientais e interação com outros genes) ou diferentes genótipos podem resultar no mesmo fenótipo. Essa situação pode ser devida a fatores tais como: penetrância incompleta, fenocópia, heterogeneidade genética e herança poligênica, entre outros (75). Hoje, a dissecção do componente genético de doenças ditas complexas é um desafio para pesquisadores de diversas áreas, encarado com o intuito de se atingir um melhor entendimento da patogênese destas doenças, possibilitando novas estratégias de diagnóstico e tratamento. Nesse contexto, estudos observacionais de genética epidemiológica, bem como análise de ligação e de associação, estão entre as possíveis ferramentas de análise genética de doenças complexas.

1.5.1. Estudos de Genética Epidemiológica Observacional

A maioria das doenças humanas resulta da interação entre variantes genéticas e fatores ambientais. Estabelecer a real contribuição dos fatores genéticos é o estágio inicial no estudo de doenças complexas. A descrição do componente genético que controla o fenótipo de interesse, e os parâmetros relacionados ao modelo genético de transmissão da doença, podem ser inferidos a partir de estudos de genética epidemiológica observacional, tais como, estudo de agregação familiar, estudos em gêmeos e Análise de Segregação Complexa (ASC) (76).

Estudos de agregação familiar são baseados no fato de que membros de uma mesma família compartilham sua informação genética e estão expostos a fatores ambientais semelhantes, em uma proporção maior do que com indivíduos escolhidos aleatoriamente na população (77). A agregação familiar de uma doença é medida pelo parâmetro chamado Risco Relativo (λ_r) definido como a prevalência da doença nos parentes de um indivíduo afetado comparado com a prevalência da doença na população geral (78). Este risco pode ser estimado entre irmãos (λ_s) e pais (λ_p), por

exemplo. A magnitude do λ_r está relacionada ao grau de herança genética concordante entre os pares de parentes afetados (75). Dessa maneira, se a genética é um contribuinte importante para a doença, a frequência da concordância da doença aumenta conforme o grau de parentesco seja maior.

Estudos em gêmeos tem tido um papel significativo para separar as influências genéticas das influências ambientais em uma doença. Esse tipo de estudo tem como racional o fato de os gêmeos monozigóticos (MZ) serem clones geneticamente idênticos, que compartilham 100% de seus genótipos em cada *locus*, enquanto que gêmeos dizigóticos (DZ) compartilham 50% dos seus alelos em todos os *loci*. Neste tipo de abordagem, discordância para a doença entre gêmeos MZ é uma forte evidência de que fatores não genéticos têm papel importante na doença (79). Simetricamente, uma maior concordância em pares de gêmeos MZ *versus* pares de gêmeos DZ é uma forte evidência de um componente genético para a doença em análise (77).

Uma vez estabelecida à existência de uma base genética para a doença, se faz necessário a realização de uma ASC, a principal ferramenta estatística usada para determinar, a partir de informações das famílias, o modelo de herança de um fenótipo em particular (80). Esta análise visa detectar a presença de um efeito genético de suscetibilidade principal, denominado de “*major gene effect*”, levando em consideração a influência de fatores genéticos e ambientais no fenótipo. Importante dizer que o termo “*major gene effect*” significa que seu efeito é forte o suficiente para ser distinguido do efeito de outros genes, mas não assume que exista um único gene envolvido. Na ASC, vários parâmetros, tais como padrões de herança, frequência do alelo deletério, penetrância, entre outros, são testados para encontrar a combinação de parâmetros que tem a maior verossimilhança (em inglês, *maximum likelihood*) para explicar os dados observados (78). Dessa maneira a quantidade e qualidade dos dados obtidos a partir das famílias são de extrema importância (76). Análises de segregação complexa, realizadas recentemente em diferentes doenças complexas têm gerado resultados promissores (81, 82). Apesar deste tipo de abordagem não produzir informações sobre a exata natureza do componente genético e nem o exato número de diferentes genes que influenciam o fenótipo (75), a técnica fornece informações valiosas sobre o modelo de herança,

que poderão ser utilizadas em estudos de mapeamento genético, como por exemplo, análises de ligação.

1.5.2. Estudos de Ligação

Análise de ligação é uma ferramenta que permite a varredura de todo o genoma humano, usando famílias multigeracionais, a fim de identificar regiões do genoma que abrigam *loci* responsáveis pelo fenótipo observado, mesmo sem suposições prévias sobre a patogênese da doença. O princípio da análise de ligação é baseado na premissa de que se um marcador polimórfico está perto do *locus* que abriga o gene de predisposição a doença, eles vão cosegregar nas famílias, ao longo das gerações, de forma mais frequente do que o esperado sob a hipótese da transmissão aleatória prevista em uma herança independente de *loci* não ligados. Quanto menor for a distância entre os dois *loci*, menor é a chance desses serem separados por *crossing over* durante a meiose (77).

Análise de ligação pode ser classificada em paramétrica e não-paramétrica. Análise de ligação é dita paramétrica quando existe um modelo de herança (autossômico dominante, autossômico recessivo, ligada ao X) preciso que explica a transmissão do *locus* marcador e *locus* doença, bem como informações sobre a frequência alélica e a penetrância de cada genótipo. Esse tipo de abordagem é mais utilizada em doenças mendelianas, para as quais o modelo genético é geralmente conhecido. Para doenças complexas, que por definição não possuem um modelo simples de herança, esse método é raramente utilizado – a exceção é quando existe dados do modelo de herança, estimados através de uma ASC realizada, de preferência, na mesma população de estudo. Infelizmente, algumas doenças complexas de interesse, tais como doença cardiovascular, câncer de próstata e doença de Alzheimer, tem uma idade de início da doença tardio, sendo difícil ou impossível obter famílias multigeracionais contendo indivíduos afetados disponíveis para obtenção de material biológico. Uma alternativa, no caso de doenças complexas, é a aplicação de análise de ligação não-paramétrica, que não exige a definição *a priori* de um modelo de herança. O racional em uma análise não-paramétrica é que, entre parentes afetados, é esperado um excesso de

compartilhamento de haplótipos idênticos por descendência (IBD - cópia do mesmo alelo parental) na região contendo o gene causal da doença, independente do modelo de herança. Entre os vários métodos de análise de ligação não-paramétrica, a abordagem mais simples é a abordagem denominada *Affected Sib-Pair* (Par de irmão afetado), no entanto, outros grupos de parentes podem ser utilizados (83).

A medida da probabilidade de ligação entre *locus* da doença e um marcador genético é em função da razão da probabilidade dos *loci* estarem ligados (fração de recombinação = θ) pela probabilidade dos *loci* não estarem ligados (fração de recombinação = 0,5). Essa razão fornece o valor de *odds* de ligação e o logaritmo das *odds* de ligação é denominado de *LOD Score* (78), sendo este método o mais eficiente para avaliação de ligação (84). *LOD Scores* positivos são evidência favorável à existência de ligação, e valores negativos excluem ligação em toda a região. Limite de significância de 5% em uma análise de ligação de *scan* genômico, considerando múltiplos *loci*, para doenças complexas, difere conforme a análise: para uma análise paramétrica, um *LOD score* de 3,3 indica ligação estatisticamente significativa; em uma análise não-paramétrica, significância estatística é atingida quando $p \leq 2 \times 10^{-5}$ e/ou o *LOD Score* $\geq 3,6$ (85).

1.5.3. Estudos de Associação

Estudos de associação têm como objetivo detectar associação entre um ou mais polimorfismos genéticos e uma característica (por exemplo, fenótipos de doença). Estudos de associação, geralmente, são dirigidos por hipóteses, e a abordagem de gene candidato é baseada na seleção de genes que se acredita terem um papel essencial no controle da suscetibilidade genética à doença, seja por estar envolvido em uma via biológica importante para a patogênese da doença, ou por estar localizado em uma região cromossômica previamente identificada em estudo de ligação. É importante ressaltar que estudos de associação têm um poder maior para detectar efeitos genéticos moderados a fracos quando comparados com estudos de ligação (86), o que os torna ideais para mapeamento fino de regiões cromossômicas previamente detectadas em ligação com a doença.

A associação entre polimorfismos genéticos e uma dada característica pode ocorrer devido a: (i) real detecção da variante genética causal (associação direta); (ii) o polimorfismo não tem um papel direto na causa da doença, mas está em desequilíbrio de ligação (DL) com a variante causal; (iii) estratificação da população em subgrupos distintos geneticamente; e (iv) associação espúria (86). Existem dois tipos principais de desenho de estudo de associação: análise de associação baseada em população e baseada em famílias (75).

Estudos de associação baseados em populações, do tipo caso-controle, investigam se um alelo em particular de um determinado gene ocorre em uma frequência significativamente elevada ou diminuída entre os indivíduos afetados não relacionados quando comparados aos controles, sendo ambos os grupos selecionados aleatoriamente da população. Nesse tipo de estudo, o grande desafio é a correta seleção da amostra populacional e o tamanho amostral, a fim de ter poder suficiente para detectar o efeito genético, se ele realmente existir.

A análise de associação baseada em famílias usa o desenho básico de trios, que consiste nos dois pais e um filho afetado. Estudo de associação baseado em famílias detecta associação quando ligação está presente. Dessa maneira, sob a hipótese nula, ou seja, ausência de ligação e associação entre o marcador e a doença, um alelo de um determinado gene, segundo a Lei de Mendel, tem 50% de chance de ser transmitido dos pais para o filho afetado (78). O teste conhecido como Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) usa como premissa que se o alelo "A" está associado com a doença e o alelo "B" não está associado com a doença, usando uma amostra constituída de pais heterozigotos, haverá uma maior transmissão do alelo "A" dos pais para o filho afetado do que para o alelo "B" (87). Esse tipo de abordagem tem a vantagem de não sofrer influência de uma possível estratificação da população, pois usa o alelo não transmitido como controle interno. No entanto, dependendo da frequência alélica do marcador em estudo, pode haver perda do poder estatístico para detectar associação alélica comum devido à sua dependência de pais heterozigotos. Pelo fato dos pais terem que estar disponíveis, o uso deste teste é limitado nas doenças de início tardio.

Atualmente, estudos de associação em larga escala que investigam o genoma inteiro – os chamados *Genome Wide Association Study* (GWAS) – tem sido

realizados com frequência. Esse tipo de estudo envolve plataformas de genotipagem de alto rendimento que tem capacidade de genotipar centenas de milhares de SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo de base única), cobrindo todo o genoma, em milhares de indivíduos não relacionados portadores da doença e indivíduos controles. Essa densidade de marcadores genéticos utilizados permite capturar informações de uma grande proporção de variantes comuns. Apesar dos GWAS serem considerados estudos geradores de hipóteses, com potencial de detecção de novos genes candidatos, essa abordagem pode se tornar problemática quando se avalia o número de testes estatístico realizados e o potencial de gerar resultados falso-positivos. Devido a isso, rigorosos níveis de significância estatística são exigidos, além da replicação dos achados em populações independentes (88). Para algumas doenças, como por exemplo, doença de Alzheimer e Crohn, GWAS tem confirmado diversos genes de suscetibilidade que foram previamente identificados em estudo de ligação e associação (89).

Pesquisadores têm utilizado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) como controle de qualidade nos estudos de associação, verificando se a amostra populacional em estudo assume uma distribuição alélica aleatória ou apresenta uma estratificação críptica no *background* genético. A lei de Hardy-Weinberg estabelece que (i) sob condições ideais, a frequência dos três genótipos AA, Aa e aa é dada pela equação $1 = p^2 + 2pq + q^2$, dessa maneira existe uma única relação entre frequência de alelos e frequência de genótipos na população; (ii) as frequências genotípicas da população permanecerão constantes de geração a geração, em equilíbrio, se as frequências dos alelos “p” e “q” permanecerem constantes (90). Sendo assim, alguns fatores como casamentos consanguíneos, migração, estratificação da população ou seleção podem levar a um desvio no HWE, bem como a deleção ou duplicação de um segmento gênico e até mesmo erro técnico na genotipagem (91). Em qualquer situação, HWE é esperado para todos os marcadores utilizados em uma análise de associação, como condição para inclusão do mesmo no estudo.

1.5.4. Desequilíbrio de Ligação

Desequilíbrio de ligação é um fenômeno genético definido como associação não aleatória entre alelos de dois ou mais *loci* que estão estreitamente ligados (92). Considerando o *locus* polimórfico 1 e seus alelos “A” e “a”, e o surgimento de uma nova mutação no *locus* 2, que apresenta seus alelos “B” e “b”: observa-se que o alelo “A” do *locus* 1 passa a segregar junto com o alelo “B” do *locus* 2 e a existência desse haplótipo depende da probabilidade da ocorrência de recombinação entre esses dois *loci*, sendo que quanto menor for o número de gerações e menor for a frequência de recombinação θ , maior é a chance que esse haplótipo persista por mais tempo na população (77).

O genoma foi retratado contendo uma série de regiões de alto DL, denominados blocos, os quais apresentam baixa diversidade haplotípica, ou seja, 3 – 5 haplótipos responsáveis por 75 a 90 % da variabilidade haplotípica do segmento (93). Estes blocos são flanqueados por pequenos segmentos de baixo DL atribuídos a *hotspots* de recombinação, que se acredita que delimitem os blocos de DL (94). Sugere-se que esses blocos são regiões de baixa recombinação (93) e variam em tamanho de poucos kb até 100 kb (92). O tamanho dos blocos haplotípicos pode variar entre as populações. Gabriel e cols. observaram que populações com ascendência Africana apresentam blocos de DL menores em comparação aos europeus, e o tamanho de bloco entre os chineses e japoneses são comparáveis entre si, sendo de tamanho intermediário (95).

Existem duas principais medidas de DL, D' e r^2 ; ambas avaliam o DL entre dois *loci* para um par de alelos (do inglês, *pairwise*). A medida D' , desenvolvida por Lewontin em 1964 e também chamada de “probabilidade de associação”, é uma importante medida para a identificação de regiões em que há pouca recombinação, e portanto, útil no seu potencial de permitir o mapeamento de um *locus* causal por estudo de associação. Porém, o parâmetro não determina diretamente a força da associação (86). A outra medida, r^2 , está relacionada com o poder de detectar associação, pois avalia o DL completo; e refere-se ao quadrado do coeficiente de correlação entre a frequência dos alelos em dois *loci*. Um r^2 de pelo menos 0,8 entre um par de SNP já indica que eles estão em alto DL (96). D' e r^2 podem variar de 0 a

1, indicando a proporção do DL, sendo que quanto maior o valor de D' ou r^2 , maior é o DL entre dois *loci*. É importante ressaltar que, mesmo quando dois *loci* apresentarem um DL completo ($D' = 1$), o valor de r^2 pode variar amplamente, devido ao fato de r^2 estar relacionado com a frequência do alelo e a posição da mutação correspondente (86).

Segundo Montgomery, o DL é importante na genética humana e biologia evolucionária, pois reflete a história da população, pelo fato de ser afetado por vários fatores, como por exemplo, seleção natural, subdivisão da população, mutação e outras forças que podem alterar a frequência gênica (92). No entanto, a aplicação do DL vai além de reunir informações sobre a arquitetura genética e história do genoma humano. Atualmente, sua finalidade está sendo dirigida para o *design* e interpretação de estudos de associação com doenças comuns e complexas. Essa ideia baseia-se no fato de que uma das causas de associação, entre um alelo de um marcador e a doença é justamente DL – quando, por exemplo, o alelo associado não está funcionalmente envolvido na patogênese da doença, mas está em DL com outro alelo, este sim, funcional e localizado num *locus* próximo.

Com o término do projeto de sequenciamento do genoma humano, tornou-se disponível informações sobre as variações genéticas representadas por milhões de SNPs. Além disso, verificou-se que 90% das variações de sequências entre os indivíduos são variantes comuns, ou seja, com $FAM \geq 0,05$, e ainda, que a maioria das variações surge a partir de eventos únicos de mutações históricas – a partir desse momento, o novo alelo é inicialmente associado a outros alelos já existentes na população (97). Essas informações, juntamente com o conhecimento dos blocos haplotípicos ao longo do genoma, veio de encontro à necessidade de se buscar uma maneira prática e financeiramente acessível de se pesquisar, no genoma inteiro, variantes candidatas para associação com doenças, usando o DL. Assim, um mapa de haplótipos do genoma foi criado, denominado de *HapMap*. O projeto internacional *HapMap* caracterizou 3.1 milhões de SNPs em 270 indivíduos oriundos de populações com ascendência em parte da África (YRI), Ásia (CHB e JPT, Chineses e Japoneses, respectivamente) e Europa (CEU), com o objetivo de determinar os padrões comuns de variação da sequência de DNA no genoma humano (variações cuja frequência alélica mínima (FAM) $\geq 0,05$), sua frequência e correlação entre

essas variações (98). Como resultado, foi possível obter informações sobre as variações genômicas sem o completo resequenciamento, dessa forma reduzindo o número de alelos polimórficos que devem ser usados num estudo de associação com doença. Recentemente houve uma expansão do projeto *HapMap*, visando a inclusão de outros tipos de variantes do genoma, em particular *Copy number variation* (CNV) e variantes raras (FAM = 0,5 – 5 %), e ainda, analisar o padrão de DL em outras 7 populações de regiões geograficamente distinta, a fim de identificar variações adicionais (99).

Com esses recentes avanços, atualmente nos estudos genéticos de associação é possível usar uma abordagem em que um grupo mínimo de SNPs, denominados “*Tag*”, dentro de um bloco haplotípico, estão fortemente associados entre si, capturando informação de uma coleção de outros marcadores, não necessariamente consecutivos ou próximos fisicamente, todos em DL nas comparações 2x2 ($r^2 > 0.8$) (93). Como consequência, aumenta-se o conteúdo de informação do estudo e reduz-se o número de marcadores a serem genotipados.

1.6. GENÉTICA DA SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO

1.6.1. Vitiligo: Uma Doença Complexa?

Diversos estudos de genética epidemiológica têm demonstrado que o vitiligo pode ser considerado uma doença genética complexa (5). As doenças genéticas complexas possuem características que as diferenciam das doenças mendelianas clássicas (100), como: (i) a doença varia na gravidade dos sintomas e idade de início, o que resulta em dificuldades na definição do fenótipo apropriado e seleção da melhor população para estudo. Idade de início precoce foi associada à ocorrência familiar de vitiligo generalizado (12). Além disso, vitiligo de início precoce está associado com maior gravidade da doença (10); (ii) a doença pode variar em seu mecanismo etiológico envolvendo várias vias biológicas. A etiopatogenia do vitiligo ainda não foi totalmente esclarecida, sendo que várias teorias têm sido propostas (35, 41, 42, 45, 69, 72); (iii) doenças genéticas complexas são frequentemente oligogênicas ou mesmo poligênicas, onde cada gene contribui com uma fração do

risco relativo total. Análises de ligação realizadas utilizando o fenótipo vitiligo identificaram *loci* de suscetibilidade localizados nos cromossomos 1, 4, 6, 7, 8, 17 e 22 co-segregando com a doença (101-103). Para essas regiões, alguns genes consistentemente associados com vitiligo foram descritos, tais como genes *HLA* (6p21) (104), *NLRP1* (17p13) (105) e *XBP1* (22q12) (106).

1.6.2. Genética Epidemiológica Observacional em Vitiligo

Os fatores genéticos que predis põem ao vitiligo vêm sendo investigados desde 1959, quando se sugeriu um modelo autossômico dominante com penetrância incompleta de transmissão da doença (14). Posteriormente, foi postulado um modelo em que alelos recessivos em múltiplos *loci* autossômicos não ligados interagem epistaticamente na patogênese do vitiligo (4).

Outras evidências para a existência de um componente genético de suscetibilidade ao vitiligo foram fornecidas através de estudos de agregação familiar de casos e estudos em gêmeos. Uma análise envolvendo 160 famílias caucasianas dos EUA confirmou agregação familiar de casos, com 20% dos afetados apresentando ao menos um familiar de primeiro grau com vitiligo. No mesmo estudo os autores estimaram o risco relativo (RR) da doença em indivíduos relacionados aos afetados que foi de sete para pais, 12 para irmãos e 36 para filhos, levando em consideração a prevalência da idade e sexo estimado em populações da Dinamarca e Índia. O RR de vitiligo para familiares de primeiro grau foi estimado entre sete a 10 vezes maior em relação à população em geral (9).

Diferenças na taxa de concordância entre pares de gêmeos MZ e DZ têm sido reportadas para a doença: o maior estudo em gêmeos já realizado em vitiligo mostrou uma taxa de 23% de concordância de vitiligo generalizado para 22 pares de gêmeos MZ em comparação com 0% em 24 pares de gêmeos DZ (8). No entanto, a falta de completa concordância para o vitiligo entre gêmeos monozigóticos sugere a importância de fatores não genéticos.

Evidência adicional da existência de um componente genético de suscetibilidade ao vitiligo vem sendo obtida a partir de análises de segregação complexa. Arcos-Burgos e cols. realizaram uma análise de segregação complexa em

56 famílias colombianas de múltiplas gerações contendo indivíduos afetados por vitiligo. Os resultados indicaram como mais adequado um modelo que assume a existência de um gene principal dominante, com forte influência de fatores ambientais agindo sobre os genótipos recessivos. Os autores foram capazes de discriminar dois grupos distintos de pacientes: (i) aqueles com aparecimento precoce da doença, cosegregando de modo dominante e sem influência de fatores ambientais; e (ii) aqueles com aparecimento tardio da doença, cosegregando com o genótipo recessivo e sofrendo forte influência de fatores ambientais (107).

Uma ampla análise de segregação complexa envolvendo 2247 chineses portadores de vitiligo e suas famílias demonstrou um modelo poligênico aditivo que melhor explica os dados coletados para doença localizada, generalizada, acrofacial e segmentar, com aproximadamente 50% de herdabilidade sendo comum para todos os tipos. Para o vitiligo universal, o modelo ambiental foi encontrado como o mais adequado (108). Apesar da análise de segregação complexa não ser capaz de produzir informações sobre a exata natureza genética de todos os genes e sequências das variações envolvidas, os autores concluíram que diferentes tipos de vitiligo são regulados por diferentes conjuntos de genes, reforçando o caráter oligo/poligênico da doença (108).

Atualmente, esforços têm sido dirigidos à investigação da exata natureza do efeito genético sobre suscetibilidade ao vitiligo, e diferentes genes e regiões candidatas têm sido descritos em associação e ligação, respectivamente, com fenótipos da doença.

1.6.3. Estudos de Ligação em Vitiligo

Estudos de ligação têm desempenhado um importante papel na elucidação do componente genético do vitiligo. A primeira análise de ligação realizada utilizando o fenótipo vitiligo foi conduzida usando três marcadores do tipo STRPs (em inglês, *Short Tandem Repeat Polymorphisms*) que flanqueavam o *locus* MITF (em inglês, *Microphthalmia-Associated Transcription Factor*), mapeado na região cromossômica 3p12.p14.1; como resultado, nenhuma evidência de ligação entre esse *locus* e a

doença foi encontrada em 26 famílias americanas e indianas afetadas por vitiligo/osteopetrose (109).

Nath e cols. identificaram evidência de ligação entre vitiligo associado ao LES e marcadores do cromossomo 17p13 em 16 famílias Euro-Americana afetadas por ambas as doenças, selecionadas de um painel de 92 pedigrees *multiplex* com LES. Análise de ligação não-paramétrica resultou no *LOD* score significativo de 4,02 para esse *locus*, denominado pelos autores de SLEV1 (*locus* na região 17p13) (110). Este resultado sugere a existência de um possível determinante genético de autoimunidade comum entre vitiligo e LES nestas famílias.

Análise paramétrica e não-paramétrica detectou ligação entre o *locus* 1p31, denominado pelos autores “AIS1” (em inglês, *Autoimmunity Susceptibility Locus 1*) e vitiligo em uma grande família multigeracional apresentando múltiplos casos de vitiligo e tireoidite de Hashimoto (*LOD* score_{np} = 3,13). No mesmo estudo, a análise foi repetida com a adição de mais 26 famílias (*LOD* score_{np} = 4,16) (111). A expansão da mesma amostra populacional para 71 famílias *multiplex* recrutadas nos EUA e Reino Unido, usadas em um scan genômico, levou a forte evidência para ligação entre o *locus* AIS1 e vitiligo (*LOD* score_{np} = 5,56) (8). Importante, as evidências de ligação entre vitiligo e o *locus* 1p31 devem ser interpretadas com cautela, uma vez que quando se remove a família *multiplex* multigeracional original (111), o *LOD* score paramétrico total das outras 26 famílias estudadas cai para 1,24, sugerindo um efeito genético exclusivo ao primeiro pedigree (111). Esta possibilidade é reforçada por dados de estudo experimental, realizado pelo mesmo grupo, que detectou variação no gene *FOXD3* localizado no *locus* AIS1, exclusivamente na família original. Assim, o efeito genético detectado para o *locus* AIS1 parece ser exclusivo de um pedigree, e não explica a ocorrência da doença na população em geral (112).

Em estudo complementar posterior, onde a coleção original de 71 famílias foi novamente expandida para um total de 102 pedigrees, evidência adicional para ligação com vitiligo foi detectada nos cromossomos 7 (*LOD* score_{np} = 3,73) e 8 (*LOD* score_{np} = 3,36). Além disso, foi confirmada a evidência de ligação para o *locus* 17p13 (*LOD* score_{np} = 3,07), anteriormente detectado em famílias *multiplex* com LES que também cosegregava casos de vitiligo (101). Finalmente, foi detectado sinal

sugestivo de ligação para quatro *loci* nos cromossomos 9, 13, 19 e 22 (101). Os sinais de ligação detectados para os cromossomos 7q e 17p parece derivar primariamente de famílias que segregam vitiligo e doenças autoimunes epidemiologicamente associadas. Já o sinal de ligação detectado para o cromossomo 8p deriva de famílias que segregam somente o vitiligo (101).

Um scan genômico independente realizado em 106 famílias *multiplex* chinesas afetadas por vitiligo generalizado identificou sinal significativo de ligação entre a doença e marcadores da região 4q13-q21 (LOD score_{np} = 4,62), além de sinais sugestivos de ligação em outros cinco *loci*: 1p36, 6p21-22, 6q24-q25, 14q12-q13 e 22q12 (102). Em estudo subsequente, dois *loci* atingiram significância estatística após a adição de 37 famílias as 106 anteriores: *locus* 22q12 (LOD score_{np} = 4,14) e 6p21-p22 (LOD score_{np} = 4,10) (103).

Conforme descrito acima, análises de ligação realizadas em populações com *backgrounds* étnicos diferentes, usando vitiligo generalizado como fenótipo, mostraram que o principal *locus* de suscetibilidade cosegregando com a doença não é o mesmo em cada população, exceto para o *locus* 22q11 (tabela 1). Isso sugere que diferentes genes podem estar envolvidos na patogênese do vitiligo em diferentes populações ao redor do mundo, caracterizando uma doença poligênica (101-103). A definição exata do(s) gene(s) envolvido(s) no controle do fenótipo em questão depende de estudos adicionais, geralmente de associação, envolvendo genes candidatos localizados na região genômica identificada na análise de ligação.

Tabela 1: Estudos genéticos de ligação em vitiligo

Region	Locus Name	Sample Size	Population	Phenotype	LOD Score*	P-value	Reference	Year
3p12-p14.1	MITF	26 families	American/ Indian	Vitiligo/osteopetrosis	NL	NS	Tripathi et al.	1999
17p13	SLEV1	16 families 102 families	European/American American / British	Vitiligo/ Lupus Erythematosus Generalized + autoimmune disease associated	4.02 3.07	2.8 x 10 ⁻⁵ 8.52 x 10 ⁻⁵	Nath et al. Spritz et al.	2001 2004
1p31.3-p32.2	AIS1	27 families 71 families 102 families	American / British American / British American / British	Vitiligo/ Hashimoto's Thyroiditis Generalized + autoimmune disease associated Generalized + autoimmune disease associated	4.16 5.56 5.59	8.5 x 10 ⁻⁴ 2.82 x 10 ⁻⁷ 2.79 x 10 ⁻⁷	Alkhatieb et al. Fain et al. Spritz et al.	2002 2003 2004
1p36		106 families 143 families	Chinese Chinese	Generalized vitiligo Generalized vitiligo	2.37 2.59	9.3 x 10 ⁻³ 4.2 x 10 ⁻³	Chen et al. Liang et al.	2005 2007
7q21	AIS2	71 families 102 families	American / British American / British	Generalized + autoimmune disease associated Generalized + autoimmune disease associated	2.87 3.73	1.31 x 10 ⁻⁴ 2.08 X 10 ⁻⁵	Fain et al. Spritz et al.	2003 2004
8p21	AIS3	71 families 102 families	American / British American / British	Generalized + autoimmune disease associated Generalized + autoimmune disease associated	1.95 3.36	1.35 x 10 ⁻³ 4.18 X 10 ⁻⁵	Fain et al. Spritz et al.	2003 2004
22q11		71 families 102 families 57 families 143 families	American / British American / British Chinese Chinese	Generalized + autoimmune disease associated Generalized + autoimmune disease associated Generalized vitiligo Generalized vitiligo	2.30 2.98 2.87 4.14	5.61 x 10 ⁻⁴ 1.06 x 10 ⁻⁴ 2.3 x 10 ⁻³ 1.5 x 10 ⁻⁵	Fain et al. Spritz et al. Chen et al. Liang et al.	2003 2004 2005 2007
4q13-q21		106 families	Chinese	Generalized vitiligo	4.62	3.0 x 10 ⁻⁶	Chen et al.	2005
6p21-p22		106 families 143 families	Chinese Chinese	Generalized vitiligo Generalized vitiligo	3.16 4.10	9.2 x 10 ⁻⁴ 1.8 x 10 ⁻⁵	Chen et al. Liang et al.	2005 2007
6q24-q25		106 families 143 families	Chinese Chinese	Generalized vitiligo Generalized vitiligo	2.98 3.33	1.6 x 10 ⁻³ 3.8 x 10 ⁻⁴	Chen et al. Liang et al.	2005 2007

* Nonparametric LOS score. NL, not linkage. NS, not significant. Suggestive Linkage (LOD > 1.86 ou p < 0.0017); Significant Linkage (LOD > 3.6 or P = 2 x 10⁻⁶).

1.6.4. Estudos de Associação em Vitiligo

1.6.4.1. Genes Não-HLA

Pelo menos 51 genes candidatos (73, 105, 106, 113-150) já foram investigados em estudos básicos de associação, caso-controle e baseado em famílias, para o vitiligo, conforme resumido na tabela 2.

Vários desses genes candidatos têm sido descritos associados com a suscetibilidade à doença; no entanto, somente alguns destes estão localizados em regiões previamente identificadas em estudos de ligação (posicional) ou/e foram encontrados associados em diferentes estudos independentes. Entre os candidatos posicionais estão os genes *GSTM1* (1p13), *PDGFRA* (4q12), *DDR1* (6p21), *NLRP1* (17p13), *XBP1* (22q12) e *GSTT1* (22q12). Entre os achados já replicados em estudos independentes, porém não identificados por estudos posicionais, estão aqueles para os genes *CAT*, *CTLA-4*, *TSLP*, *TGFBR2*, *PTPN22* e *COMT*. Já alguns dos genes candidatos estudados por outros grupos, como por exemplo, os genes *FOXP3* e *PRO2268*, podem ser considerados inconclusivos em relação ao seu papel na patogênese da doença, pois ainda precisam ser testado para replicação em estudos adicionais com populações independentes. Alguns deles, por estarem localizados em *loci* promissores, outros para confirmar seu real *status* de associação, sejam por apresentar um nível de significância marginal ou por não apresentar correção para múltiplos testes.

Em uma análise combinada entre os resultados obtidos nos estudos de associação e ligação, em geral, os sinais de ligação já detectados para o vitiligo não parece corresponder à localização cromossomal dos vários genes candidatos estudados para a doença. Uma razão para isso pode ser que estudos de associação, têm um poder maior para detectar a contribuição genética de diversos genes de efeitos pequeno a moderado (151), enquanto que análises de ligação têm poder de detectar apenas *loci* exercendo efeitos principais. Isso indica que esses genes podem ter um efeito modesto na suscetibilidade ao vitiligo.

Tabela 2: Genes não-HLA investigados por estudos de associação no vitiligo.

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year
ACE	17q23.3	C C	120 / 429	Korean	Generalized / Focal	I/D 287 base pair	Intron 16	P=0.012 / 0.032c	1.46 (1.08 - 1.92)	Jin et al	2004
		C C	106 / 174	English	Generalized (Non-Segmental)	I/D 287 base pair	Intron 16	NS	-	Akhtar et al	2005
		C C	125 / 156	Indian	Generalized	I/D 287 base pair	Intron 16	NS	-	Dwivedi et al	2008
		C C	48 / 50	Turkish	Vitiligo <i>per se</i>	I/D 287 base pair	Intron 16	NS	-	Pehlivan et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs4343 ²	Exon 17	NS	-	Birlea et al	2011
AIRE	21q22.3	F B	126 F (705 P)*	American / British	Generalized	rs1800522	Exon 14	NS	-	Jin et al	2007
		C C	86 / 363	English	Vitiligo <i>per se</i>	rs1800521 (T7215C)	Exon 10	P=0.000013	3.12 (1.87 - 5.46)	Ahnini et al	2008
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs3788116 ¹	#	NS	-	Birlea et al	2011
ASIP	22q11.22	C C	114 / 111	Korean	Vitiligo <i>per se</i>	g.8818A/G	3' UTR	NS	-	Na et al	2003
			97 / 59	Hungarian	Vitiligo <i>per se</i>	g.8818A/G	3' UTR	NS	-	Széll et al	2008
bFGF	4q28.1	C C	51 / 118	Taiwanese	Generalized	rs1476215	3' UTR	NS	-	Lan et al	2009
CAT	11p13	C C	235 / 177	American / Canadian	Non-segmental	rs769217 - codon 389	Exon 9	P=0,0024c	NA	Casp et al	2002
		F B	43 IF			rs769217 - codon 389	Exon 9	P= 0.047	NA		
		C C	118 / 200	Korean	Focal / generalized	rs7943316 rs769217 - codon 389 rs7943316 / rs769217	Promoter Exon 9 Haplotype	NS NS P<0.01	- - NA	Park et al	2006
		C C	166 / 169	English	Non-segmental / segmental	rs769217 - codon 389	Exon 9	0.030c	NA	Gavalas et al	2006
		C C	126 / 143	Indian	Vitiligo <i>per se</i>	rs769217 - codon 389	Exon 9	NS	-	EM, et al	2007
C C	749 / 763	Chinese	Vitiligo <i>per se</i>	rs7943316 (-89 A>T) rs769217- codon 389 C>T rs11032709 - codon 419 C>T	Promoter Exon 9 Exon 10	P<0.001 NS NS	1.54 (1.25 - 1.91) - -	Liu, et al	2010		

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year
						T(-89) C(389) T(-89) T(389)	Haplotype Haplotype	P<0.001 P<0.001	1.90 (1.26 -2.86) 2.80 (1.24 - 6.30)		
		M A	645 / 689	English, Asian, Caucasian	Vitiligo <i>per se</i>	rs769217- codon 389 C>T	Exon 9	P=0.002	1.43 (1.14 - 1.80)	Lv et al	2010
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs769217 rs7943316	Exon 9 Promoter	NS NS	- -	Birlea et al	2011
		C C	34 / 49	Turkish	Vitiligo <i>per se</i>	ASP-389	Exon 9	NS	-	Bulut et al	2011
CCR5	3p21	C C	48 / 50	Turkish	Vitiligo <i>per se</i>	32 base pair deletion	-	NS	-	Pehlivan et al	2009
CD4	12p13.3	C C	144 / 144	Iranian	Non-Segmental	CD4-1188 (TTTTTC)*A4	Promoter	P<0.01c	2.02 (1.26 - 3.22)	Zamani et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs2855534 ²	5'near gene	NS	-	Birlea et al	2011
COMT	22q11.1-q11.2	C C	50 / 66	Turkish	Non-Segmental - Acrofacial	val108/158met (low activity)	Exon 4	P=0,047	NA	Tursen et al	2002
		C C	749 / 763	Chinese	Vulgar / focal - early age onset	codon 158 G>A (rs4680)	Exon 4	P<0.001	1.42 (1.15 - 1.75)	Li et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs4680	Exon 4	NS	-	Birlea et al	2011
COX2	1q25.2	C C	755 / 774	Chinese Han	Non-Segmental	-1195A>G (rs689466) -765 G>C -8473 T>C	Promoter Promoter Promoter	P = 0.004c NS NS	1.39 (1.11 - 1.74) - -	Li et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs689466	Promoter	NS	-	Birlea et al	2011
CTLA-4	2q33	C C	74 / 173	British	Vitiligo + autoimmune disease associated	(AT)n 106bp allele	Exon 3	P=0.0001d	-	Kemp et al	1999
		C C	100 / 140	British	Vitiligo + autoimmune disease associated	MH30*	-	P=0.007	2.6 (1.2-5.6)	Blomhoff et al	2005
						CTLA4 + 49 (rs231775) CT60 (rs3087243)	Exon 1 3'near gene	NS NS	- -		

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year
						JO31 (rs11571302)	#	P=0.02	2.1 (1.1–4.3)		
						JO30 (rs7565213)		P=0.01	2.3 (1.2–4.9)		
						JO27_1 (rs11571297)	#	NS	-		
		C C	36 / 100	Turkish	Generalized / Localized	96 bp allele	-	P=0.02	-	Itirli et al,	2005
		F B	126 F (712P)*	American / British	Generalized + autoimmune disease associated	rs1863800	#	NS	-	LaBerge et al	2008
						rs231775	Exon 1	NS	-		
						rs3087243	3'near gene	NS	-		
						rs11571302	#	NS	-		
						rs11571297	#	NS	-		
						rs10932037	#	NS	-		
		C C	48 / 50	Turkish	Vitiligo <i>per se</i>	CTLA4 + 49 (rs231775)	Exon 1	P= 0.002	0.83 (0.73 - 0.94)	Pehlivan et al	2009
		C C	66 / 85	Romanian	Generalized + autoimmune disease associated	rs1863800	#	NS	-	Birlea et al	2009
						rs231806	#	NS	-		
						rs231775	Exon 1	NS	-		
						rs3087243	3'near gene	NS	-		
						rs11571302	#	NS	-		
						rs11571297	#	NS	-		
						rs10932037	#	NS	-		
		C C	101 / 100	Romanian	Vitiligo + autoimmune disease associated	rs231775	Exon 1	P=0.06	1.69 (0.87 - 2.05)		
		M A	267 / 325 + 126 F*	British / Romanian	Vitiligo + autoimmune disease associated	rs231775	Exon 1	P=0,01	OR=1.4		
			166 / 225 + 126 F*	British / Romanian		rs231806	#	NS	-		
						rs3087243	3'near gene	NS	-		
						rs11571302	#	NS	-		
						rs11571297	#	NS	-		
		C C	175 / 180	Indian	Non-Segmental / Segmental	CTLA4 + 49 (rs231775)	Exon 1	NS	-	Deeba et al	2010

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs231775	Exon 1	0.00026; 0.00099c	1.18 (1.07 - 1.30)	Birlea et al	2011
DDR1	6p21	F B	188 F (596 P)*	Brazilians	Non-Segmental / Segmental	rs4618569	5' Near Gene	P=0.002	5.27 (1.59 - 17.40)	Silva de Castro	2010
						rs1049623	Exon 15	P=0.05	1.73 (0.97 - 3.08)		
						rs2267641	Exon 17	P=0;01	3.47 (1.22 - 9.17)		
		C C	134 / 134	Brazilians	Non-Segmental / Segmental	rs2267641	Exon 17	P=0.04	6.0 (1.73 - 52.33)	Silva de Castro	2010
		C C	220 / 409	Korean	Non-segmental	rs1049623	Exon 15	NS	-	Kim et al	2010
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs2267641	Exon 17	NS	-	Birlea et al	2011
ESR1	6q25.1	C C	120 / 254	Korean	Generalized	rs2234693	Intron 1	P=0.034 b	1.41 (1.03 - 1.95)	Jin et al	2004
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs2234693	Intron 1	NS	-	Birlea et al	2011
EDN1	6p23-p24	C C	312 / 313	Korean	focal, segmental, generalized, universal	rs2071942-rs5370	Haplotype	P<0,0001	N.A	Kim et al	2007
		C C	51 / 118	Taiwanese	Generalized	rs2071943 rs5370	Intron 2 Exon 5	NS NS	- -	Lan et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs5370	Exon 5	NS	-	Birlea et al	2011
FAS	10q24.1	C C	750 / 756	Chinese Han	Vitiligo <i>per se</i>	rs2234767 (-1377 G>A)	Promoter	P=0,006c	1.35 (1.09 - 1.66)	Li et al,	2008
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1800682	5' Near Gene	NS	-	Birlea et al	2011
FASLG	1q23	C C	750 / 756	Chinese Han	Vitiligo <i>per se</i>	rs763110 (-844 T>C)	Promoter	NS	-	Li et al,	2008
FBXO11	2p16.3	C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs441327 ¹	#	NS	-	Birlea et al	2011
FOXD3	1p31.3	C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs11208184 ¹	#	P=0.02	1.26 (1.02 - 1.54)	Birlea et al	2011
FOXP3	Xp11.23	C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs11798415 ¹	#	P = 0.00058	1.19 (1.07 - 1.32)	Birlea et al	2011
GSTM1	1p13.3	C C	310 / 549	Korean	Generalized / focal	GSTM1-null (rs2071487)	Exon 7	P<0.001	2.05 (1.52 - 2.74)	Uhm et al,	2007

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year
		C C	749 / 763	Chinese	Vitiligo <i>per se</i>	GSTM1-null	-	P=0.059	1.22 (0.99 - 1.49)	Liu et al,	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs638820 ¹	#	P=0.02	1.07 (0.97 - 1.17)	Birlea et al	2011
<i>GSTT1</i>	22q11.23	C C	310 / 549	Korean	Generalized / focal	GSTT1- present	-	NS	-	Uhm et al,	2007
		C C	749 / 763	Chinese	Vitiligo <i>per se</i>	GSTT1-null (rs2234953)	Exon 4	P<0.001	1.42 (1.16 - 1.75)	Liu et al,	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1006771 ¹	#	P=0.0055	1.19 (1.04 - 1.35)	Birlea et al	2011
<i>GSTM1/GSTT1</i>		C C	58 / 150	Italian	Generalized / focal	GSTM1/GSTT1-null	-	P=0.03	2.33 (1.07 - 5.07)	Guarneri et al	2011
<i>GSTP1</i>	11q13	C C	749 / 763	Chinese	Vitiligo <i>per se</i>	GSTP1 - Ile105Val (rs1695)	Exon 5	NS	-	Liu et al,	2009
<i>GPX1</i>	3p21.3	C C	126 / 143	Indian	Vitiligo <i>per se</i>	rs1050450 - codon 200	Exon 2	NS	-	EM, et al	2007
<i>HGF</i>	7q21.11	C C	51 / 118	Taiwanese	Generalized	rs5745635 rs5745687	Exon 3 Exon 8	NS NS	- -	Lan et al	2009
<i>IFNG</i>	12q14	C C	176 / 545	Iranian	Generalized	+874 T/A	Intron 1	NS	-	Namian et al	2009
<i>IL1-RN</i>	2q14.2	C C	48 / 50	Turkish	Vitiligo <i>per se</i>	86 base pair (VNTR)1/5 allele 86 base pair (VNTR) 5 allele	Intron 2	P= 0.015c P = 0.016	1.13 (1.02 - 1.25) 1.06 (1.01 - 1.11)	Pehlivan et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs419598 ²	Exon 4	NS	-	Birlea et al	2011
<i>IL-4</i>	5q31	C C	48 / 50	Turkish	Vitiligo <i>per se</i>	rs2243250 (-590 C/T)	Promoter	NS	-	Pehlivan et al	2009
<i>IL-10</i>	1q32.1	C C	184 / 101	Saudi	Vitiligo <i>per se</i>	IL10-819 (rs1800871) IL10-592 (rs1800872) IL101082	Promoter Promoter Promoter	P=0.02 P=0.02 P = 0.05	RR=1.99 RR=1.99 RR=2.25	Abanmi et al	2008
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1800872 rs1800871	Promoter Promoter	NS NS	- -	Birlea et al	2011
<i>LMP2</i>	6p21.3	C C	230 / 188	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs17587	Exon 3	NS	-	Casp et al,	2003
		F B	38 IF	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs17587	Exon 3	P=0.023	-		

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year
<i>LMP7</i>	6p21.3	C C	230/ 188	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs2071543	Exon 2	NS	-	Casp et al,	2003
						-	Intron 6	0.040 b	-		
		F B	26 IF 45 IF	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs2071543	Exon 2	NS	-		
						-	Intron 6	0.000057	-		
<i>MECL1</i>	16q22.1	C C	230 / 188	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs20549	Exon 4	NS	-	Casp et al,	2003
		F B	47 IF			rs20549	Exon 4	NS	-		
<i>MBL2</i>	10q11.2-q21	C C	40 / 50	Turkish	Vitiligo <i>per se</i>	codon 54 codon 57	Exon 1 Exon 1	P<0,001 NS	NA -	Onay et al,	2007
		C C	92 / 94	Indian	Generalized	codon 52 - rs5030737 codon 54 - rs1800450 codon 57 - rs1800451	Exon 1 Exon 1 Exon 1	P=0.02 NS NS	0.08 (0.004 - 1.46) - -	Dwivedi et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1800450	Exon 1	NS	-	Birlea et al	2011
<i>MC1R</i>	16q24.3	C C	114 / 111	Korean	Vitiligo <i>per se</i>	rs1805008 (Arg160Trp)	Exon 1	NS	-	Na et al	2003
		C C	97 / 59	Hungarian	Skin Type (Fitzpatrick I, II, III, IV)	rs1805008 (Arg160Trp)	Exon 1	P=0.026	3.6 (0.0046 - 0.1003)	Széll et al	2008
		C C	20 / 20	Iranian	Vitiligo <i>per se</i>	rs1805008 (Arg160Trp)	Exon 1	NS	-	Eskandani et al	2010
<i>MPO</i>	17q23.1	C C	54 / 58	Turkish	Generalized, acrofacial, local	G-463A	Promoter	NS	-	Aksoy et al	2009
<i>MYG1</i>	12q13	C C	124 / 325	Estonia	Focal, Segmental, Acrofacial, Universal	rs1465073 (-119 C/G)	Promoter	P= 0.03	1.37 (1.02 - 1.85)	Philips et al.	2010
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1465073	#	NS	-	Birlea et al	2011
<i>NLRP1</i>	17p13	F B	114 F (656 P)*	American / British	Generalized + autoimmune disease associated	rs6502867	Intron 15	P< 0.001a	2.8 (1.37 - 3.15)	Jin et al,	2007
						rs4790797	#	P<0.001a	2.1 (1.39 - 2.91)		

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year
		C C	66 / 93	Romanian	Generalized	rs6502867 rs2670660	Intron 15 #	P= 0.019b P=0.039b	1.86 (1.09 - 3.21) 1.54 (1.03 - 2.39)	Jin et al,	2007
		C C	26 / 61	Jordanian Arab	Generalized	rs1008588 rs2670660	# #	P=0.027 P=0.038	N.A N.A	Alkhateeb et al	2010
<i>Nrf2</i>	2q31.2	C C	300 / 300	Chinese Han	Vitiligo <i>per se</i>	rs6721961 (- 650 A/C)	Promoter	P<0,01c	2.90 (1.62 - 5.18)	Guan et al,	2008
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs8470 ¹	#	NS	-	Birlea et al	2011
<i>PDGFRA</i>	4q12	F B	143 F	Chinese Han	Generalized	c.418 G>T c.2986 G>A c.3098 A>T c.3154 A>T	Exon 4 Exon 22 Exon 22 Exon 23		3,5 % P= 0,008e	Xu et al	2010
		C C	480 / 480	Chinese Han	Vitiligo <i>per se</i>	c.418 G>T c.2986 G>A c.3098 A>T c.3154 A>T	Exon 4 Exon 22 Exon 22 Exon 23	NS NS NS NS	- - - -		
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs3690 ¹	3' UTR	P=0.024	1.14 (1.00 - 1.31)	Birlea et al	2011
<i>PRO2268</i>	12q14	C C	100 / 194	Estonia / Caucasian	Generalized, Acrofacial, focal, universal	rs10784680	#	P = 0,000013 c	5.66 (2.59 - 12.37)	Douroudis et.al	2011
<i>PTPN22</i>	1p13.3-p13.1	C C	165 / 304	English	Generalized	1858 C/T (R620W)	Exon 14	P=0.006 / 0.005 c	1.82 (1.17 - 2.82)	Canton et al,	2005
		C C	126 / 140	Indian	Generalized	1858 C/T (R620W)	Exon 14	NS	-	Laddha et al	2008
		C C	65 / 111	Romanian	Generalized	1858 C/T (R620W)	Exon 14	0.013 / 0.036 c	2.92 (1.21 - 7.03)	LaBerge et al,	2008
		F B	126 F (712 P)*	American / British	Generalized + autoimmune disease associated	rs2476601 -1858C/T (R620W)	Exon 14	P=0.024 a	2.16 (1.22 - 3.82)	LaBerge et al,	2008
		C C	55 / 85	Jordanian Arab	Generalized	1858 C/T (R620W)	Exon 14	NS	-	Alkhateeb et al	2010
<i>SCF</i>	12q21.32	C C	51 / 118	Taiwanese	Generalized	rs11104947 rs995029/rs11104947	Intron 1 Haplotype	P=0.036 N.A	1.95 (1.16 - 3.28) 2.45 (1.03 - 5.85)	Lan et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs11104947	Intron 1	NS	-	Birlea et al	2011

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year
SCGF	19q13.3	C C	51 / 118	Taiwanese	Generalized	rs13866 rs7246355	3' UTR 5' Near Gene	P=0.032 P=0.032	3.26 (1.16 - 9.18) 2.00 (1.22 - 3.29)	Lan et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs7246355	5' Near Gene	NS	-	Birlea et al	2011
STAT4	2q32.3	C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs7574865	Intron 3	NS	-	Birlea et al	2011
TAP1	6p21.3	C C	230 / 188	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs735883 rs1800453	Intron 7 Exon 10	NS 0.0034 b / 0.0094 c	- -	Casp et al,	2003
		F B	50 IF 35 IF	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs735883 rs1800453	Intron 7 Exon 10	0.011 0.028	- -		
TAP2		C C	230 / 188	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs1800454 rs241447	Exon 5 Exon 11	NS NS	- -	Casp et al,	2003
		F B	22 IF 56 IF	American / Canadian	Non Segmental + early of onset	rs1800454 rs241447	Exon 5 Exon 11	NS NS	- -		
TAP1-PSMB8		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1135216	Exon 10	NS	-	Birlea et al	2011
TFNA	6p21.31	C C	61 / 123	Turkish	Generalized, acrofacia	TNF-308 G/A	Promoter	NS	-	Yazici et al	2006
		C C	176 / 545	Iranian	Generalized	TNF-308 G/A (rs1800629)	Promoter	P=0.0004c	NA	Namian et al	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1800683 ¹	Exon 1	P=0.0018	1.21 (1.09 - 1.33)	Birlea et al	2011
TGFB2	3p24.1	C C	233 / 415	Korean	Non-Segmental Vitiligo	rs2005061 rs3773649	Intron 3 Intron 6	P=0.0006c P=0.0069	0.65 (0.51 - 0.82) 0.45 (0.27 - 0.75)	Yun et al	2010
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs2005061	Intron 3	P=0.023	1.16 (1.00 - 1.35)	Birlea et al	2011
TSLP	5q22.1	C C	160 / 568	Korean	Generalized, Localized, Segmental	rs3806933 (-847 C>T)	Promoter	P= 0.004c	1.48 (1.31-1.95)	Cheong et al.	2009
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs3806933 rs764916	Promoter Promoter	NS P=0.0003	- NA	Birlea et al	2011

Gene	Region	Design	Sample case/control Families (person)	Population	Phenotype	Variants	Position	P-Value	OR (CI - 95%)	Author	Year			
TXNDC5	6p24.3	C C	230 / 417	Korean	Non-Segmental Vitiligo	rs1043784	Exon 13	P= 0.035c	1.79 (1.15 - 2.78)	Jeong et.al.	2010			
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1043784	Exon 13	NS	-	Birlea et al	2011			
UVRAG	11q13.5	C C	225 / 439	Korean	Non-Segmental Vitiligo	rs1458836	5' near gene	P= 0.023dc	1.38 (1.04 - 1.82)	Jeong et al	2010			
						rs7933235	Intron 1	P= 0.016dc	1.40 (1.06 - 1.86)					
						rs1458836/rs7933235	Haplotype	P=0.04	1.39 (1.05 - 1.84)					
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs1458836	5' near gene	NS	-	Birlea et al	2011			
rs7933235	Intron 1	NS	-											
rs1458836 - rs7933235	Haplotype	NS	-											
VDR	12q13.11	C C	31 / 33	Romanian	Generalized	Apa - I (rs7975232)	Intron 9	P = 0.029c	OR = 2.03	Birlea et al	2006			
		C C	1392 / 2629	European	Generalized	rs7975232	Intron 9	NS	-	Birlea et al	2011			
XBP1	22q12.1	C C	319 / 294	Chinese Han	Vitiligo <i>per se</i>	rs2269577	Promoter	P=0.007	1.36 (1.09 - 1.71)	Ren et al	2009			
						365 / 404	Chinese Han	Vitiligo <i>per se</i>	rs2269577			Promoter	P= 0.008	1.31 (1.07 - 1.59)
						1402 / 1288	Chinese Han	Vitiligo <i>per se</i>	rs2269577			Promoter	P=0.003	1.18 (1.06 - 1.32)
		C C	896 / 1515	European	Generalized	rs2269577	Promoter	P=0.00075	1.17 (1.06 - 1.29)	Birlea et al	2011			
		M A	2653 / 2980	European / Chinese	Generalized	rs2269577	Promoter	P= 0.0000000095	1.21 (1.13 - 1.19)					

C C, Case-Control Design. FB, Family Based Design. M A, Meta analyse design. * F, families, (P =person). IF, Informative Families.¹, most highly associated SNP in the region.2, SNP in strong LD with the candidate marker. #, Intergenic region.a, Conditional Logistic-Regression Analysis. b, Allelic association.c, genotypic association. d, p-value uncorrected. e, frequency of mutation in familial cases of vitiligo compared with the general population. NS, not significant. NA, not available. OR, odds ratio. CI, confidence interval.

1.6.4.2. Genes *HLA*

Diversos estudos têm reportado associação entre variantes de genes *HLA* com suscetibilidade para desenvolver vitiligo em diferentes grupos étnicos (152-162) (quadro 1). Esses estudos foram realizados testando diversos marcadores da região do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) em pacientes com diferentes fenótipos de vitiligo *versus* controles, em populações de diferentes regiões geográficas.

POPULAÇÃO	ESPECIFICIDADE ASSOCIADA	AUTOR / ANO
Americana	HLA - DR4	Foley et al, 1983
Kuwaitiana	HLA - B21, Cw6, DR53	Al-fouzan et al, 1995
Afro - Americana	HLA - A1, A2, A31, DR4, DQ3	Kachru et al, 1978; Dunston et al, 1990
Holandesa	HLA - DR4, DR6	Venneker et al, 1993
Italiana do Norte	HLA - A30, Cw6, DR6, DR7, DQ3	Valsecchi et al, 1995; Orecchia et al, 1992, Finco et al, 1991
Eslovaca	HLA - A2	Bluc et al, 1996
Omani	HLA - DR7	Venkataram et al, 1995
Alemã	HLA - A2, DR12	Schallreuter et al, 1993
Turca	HLA - DR3, DR4, DR7	Tastan et al, 2004
Saudita	HLA - B7, Bw6, Cw6, Cw7, DR4	Abanmi et al, 2006
Indiana	HLA - A2, A11, A31, B17, B35, B44	Misri et al, 2009

Quadro 1: Descrição dos antígenos HLA associados ao vitiligo em diferentes grupos étnicos.

Nota: Adaptado de Rezali N, Gavalas NG, Weetman AP, Kemp EH. *Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo*. J. Eur Acad Dermatol Venereol. 2007; 21(7): 865-76

Embora em geral esses estudos não tenham encontrado associação consistente entre a ocorrência de vitiligo e alelos *HLA*, há notáveis exceções, como os sinais de associação observados para os alelos *HLA-A2*, *HLA-DR4* e *HLA-DR7*. Uma meta-análise, realizada por Liu e cols., encontrou associação entre vitiligo e *HLA-A2* (163). Estudos utilizando métodos moleculares mais robustos e análise de associação baseada em famílias encontraram associação genética entre vitiligo generalizado e alelos dos genes *HLA-DRB4*0101* e *HLA-DRB1*0303* em pacientes holandeses (164); alelos dos genes *HLA-DRB1*0301*, *HLA-DRB1*0401* e *HLA-DRB1*0701* em turcos (161), alelos dos genes *DRB1*0701*, *DQB1*0201* e *DPB1*1601* em eslovacos (165) e o alelo 122 do microsatélite D6S265, localizado no cromossomo 6p21.3-p21.4 em colombianos (107). Em famílias *multiplex*

caucasianas com vitiligo generalizado, o haplótipo formado com os genes HLA classe II *HLA-DRB1*04-(DQA1*0302)-HLADQB1*0301* estava associado tanto com aumento de risco ao vitiligo como com início precoce da doença (166). Em chineses da etnia Han, o haplótipo *HLA A25-Cw*0602-DQA1*0302* estava associado com vitiligo generalizado (167). Entre os alelos HLA de classe II, *DRB1*07* tem sido consistentemente associado com vitiligo em chineses da etnia Han (168, 169).

Recentemente, um robusto e consistente estudo caso-controle realizado em duas populações indianas independentes recrutadas no norte e oeste da Índia, composta por 1.404 e 355 casos respectivamente, investigou o papel dos alelos HLA-classe I e II na manifestação do vitiligo. Os autores encontraram que as frequências dos alelos *HLA A*33:01*, *B*44:03* e *DRB1*07:01* estão significativamente aumentadas nas duas populações de casos quando comparados aos controles. Ainda, sugere-se que a associação entre o alelo *DRB1*07:01* e vitiligo seja primária, pois na ausência dos alelos *A*33:01* e *B*44:03*, a associação entre vitiligo e *DRB1*07:01* mantém-se altamente significativa em ambas populações estudadas. Além disso, os autores compararam a sequência de aminoácidos na fenda de ligação dos peptídeos das moléculas HLA-A, -B e -DR, e uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na cadeia α de HLA-A e HLA-B e na cadeia β de HLA-DR quando comparados pacientes com vitiligo e controles, o que auxilia no entendimento das bases moleculares de predisposição e proteção para a doença (170).

O real significado dos inúmeros achados de associação entre genes HLA e vitiligo ainda é obscuro, em parte devido à associação desses genes com outras doenças autoimunes. No entanto, essas iniciativas contribuíram para somar evidências de que a doença tem um componente autoimune na sua patogênese.

1.6.4.3. *Genome Wide Associations Study (GWAS)*

Até o momento, três GWAS independentes foram realizados em vitiligo, cada um deles com características específicas e levando a resultados promissores. O primeiro GWAS analisando o fenótipo vitiligo foi realizado utilizando uma população composta por 32 indivíduos com grau de parentesco distante, afetados com vitiligo

generalizado e outras doenças autoimune epidemiologicamente associadas ao vitiligo, e 50 indivíduos controles não relacionados das comunidades vizinhas. Os casos eram oriundos de uma população fundadora, geográfica e geneticamente isolada no norte da Romênia, cuja prevalência de vitiligo foi estimada em 2,9%. Foram testados 310.598 Tag SNPs, e o sinal de associação mais significativo foi de $P_{\text{corrigido}} = 8,51 \times 10^{-8}$; OR= 7.44 (95% CI = 3,56–15,53) para o SNP rs13208776, localizado no intron 4 do gene *SMOC2* localizado na região cromossômica 6q27. O gene *SMOC2* está localizado próximo ao locus que contém o gene *IDDM8*, o qual já foi descrito em ligação e associação com Diabetes tipo I e artrite reumatóide (171). Infelizmente, os autores não realizaram nem o mapeamento fino do locus encontrado, nem a replicação do sinal em uma população independente, limitando assim a interpretação do resultado.

O segundo GWAS utilizou uma abordagem clássica: inicialmente foram genotipados 579.146 SNPs em 1.514 pacientes com vitiligo generalizado oriundos da América do Norte e Reino Unido, e as frequências alélicas foram comparadas com as de 2.813 controles de ancestralidade também europeia cujos genótipos estão disponíveis em bancos de dados públicos. Os autores encontraram 124 SNPs para os quais a análise atingiu significância estatística a nível de GWAS ($P < 5 \times 10^{-8}$), localizados na região do MHC no cromossomo 6p21.3. Através de análise de regressão logística, foi possível identificar dois principais sinais independentes de associação, sendo um deles na região de classe I, entre os genes *HLA-A* e *HCG9* representado pelo SNP rs12206499 ($P = 1,24 \times 10^{-19}$ OR=1,58), e o outro na região de classe II, entre os genes *HLA-DRB1* e *HLA-DQA1*, representado pelo SNP rs532098 ($P = 4,83 \times 10^{-30}$ OR = 1,74). Neste mesmo estudo, os autores também encontraram associação entre vitiligo generalizado e SNPs localizados em sete diferentes regiões cromossômicas não-MHC, tais como: locus 1p13.2 – gene *PTPN22* (rs2476601 $P = 9,82 \times 10^{-9}$ OR=1,54), locus 3q28 – gene *LPP* (rs1464510 $P = 6,4 \times 10^{-9}$ OR = 1.32; rs13076312 $P = 3,9 \times 10^{-8}$ OR = 1.30), locus 10p15.1 – gene *IL2RA* (rs706779 $P = 1,14 \times 10^{-9}$ OR=1.35; rs7090530 $P = 1,54 \times 10^{-9}$ OR=1.35), locus 21q22.3 – gene *UBASH3A* (rs2839511 $P = 1,7 \times 10^{-8}$ OR=1.36), locus 22q13.1 – gene *C1QTNF6* (rs229527 $P = 4,36 \times 10^{-9}$ OR=1.33), locus 1p36.23 – gene *RERE* (rs301819 $P = 8,85 \times 10^{-9}$ OR=1.32) e locus 11q14.3 (rs1847138 $P = 2,0 \times 10^{-10}$

OR=1.42; rs1393350 $P = 3,24 \times 10^{-13}$ OR=1.54). Sinal sugestivo de associação foi obtido para o *locus* 14q12 – gene GZMB (rs8192917 $P = 5,54 \times 10^{-6}$ OR=1.28) (172).

Para validar os resultados positivos encontrados, foram selecionados 50 SNPs com os maiores sinais de associação, distribuídos nas 10 regiões cromossômicas detectadas, e esses marcadores foram genotipados em duas populações distintas de ancestralidade europeia: a primeira população do tipo caso-controle, formada por 677 pacientes independentes afetados com vitiligo generalizado e 1106 controles saudáveis, e uma segunda população de famílias, composta por 183 trios *simplex* e 332 famílias *multiplex*. SNPs próximos ou na região de classe I e II e dos genes *LPP*, *GZMB*, *UBASH3A*, *C1QTNF6*, foram replicados em ambas as populações; os marcadores próximos ou intragênicos aos genes *PTPN22* e *IL2RA* foram replicados somente na população de famílias e os SNPs próximos ou intragênicos aos genes *RERE* e *TYR* foram replicados somente na população caso-controle. É interessante mencionar que, com exceção dos genes *RERE*, *GZMB* e *TYR*, os demais genes identificados associados com vitiligo neste estudo já foram descritos previamente associados às doenças autoimune epidemiologicamente associadas ao vitiligo (172)

Em estudo subsequente, Jin e cols. reanalisaram sete *loci*, oriundos do estudo realizado pelo mesmo grupo em 2010 (172), que apresentaram nível de significância sugestivo de associação no GWAS ($P < 10^{-4}$), a saber – *FOXP1* (*locus* 3p13), *CCR6* (*locus* 6q27), *MYH15* (*locus* 3q13.13), *ICA1* (*locus* 7p21.3), *TBC1D2* (*locus* 9q22.33), *IK2F4* (*locus* 12q13.2) e *SH2B3* (*locus* 12q24.12) – e genotiparam os marcadores mais significativamente associados para cada *locus* nas duas populações independentes de replicação, previamente descritas. Após uma análise combinada do tipo meta-análise, incluindo os resultados do GWAS + replicação população 1 + replicação população 2, somente os *locus* contendo o gene *FOXP1* (rs17008723 $P_{\text{combinado}} = 1,04 \times 10^{-8}$ OR=1.33) e *CCR6* (rs6902119 $P_{\text{combinado}} = 3,94 \times 10^{-7}$ OR=1.23) atingiram significância (173). Salientamos que o SNP rs6602119 não está em DL ($r^2=0$) com o marcador rs13208776 do gene *SMOC2*, previamente descrito em associação com o vitiligo.

Em uma terceira etapa, os dados do GWAS original (172), foi reanalisado considerando vitiligo de início precoce como uma característica quantitativa, e os

sinais positivos de associação foram confirmados em uma população de replicação independente. Foi testada associação entre o fenótipo e 520.460 SNPs em 1339 casos, e identificou-se um forte sinal de associação localizado no cromossomo 6p21.3, região MHC classe II, exercido independentemente pelos SNPs rs7758128, localizado próximo à *C6orf10-BTNL2* ($P_{\text{combinado}} = 8,14 \times 10^{-11}$ OR=1.50) e rs532098, localizado na vizinhança dos genes *HLA-DRB1-DQA1* ($P_{\text{combinado}} = 4,23 \times 10^{-6}$ OR=1.15) (174). Esses dados sugerem que a região MHC classe II tem uma específica influência no vitiligo de início precoce, ao contrário dos outros *loci* já descritos associados com vitiligo generalizado nos GWAS anteriores.

O maior GWAS em vitiligo até o momento foi realizado por Quan e cols. em uma população de *background* étnico chinês, diferente dos estudos anteriores. Inicialmente foram genotipados 620.901 SNPs e CNVs em 1.149 indivíduos afetados por vitiligo generalizado e 1.468 controles. Os autores detectaram dois sinais independentes de associação, sendo o mais significativo deles para o marcador rs11966200 ($P = 2,01 \times 10^{-11}$; OR = 1,92) localizado na região MHC classe III; o outro sinal foi observado para o marcador rs9468925 ($P = 2,21 \times 10^{-8}$; OR=0,72), localizado na região HLA-C/HLA-B. Detectou-se baixo grau de desequilíbrio de ligação entre o rs11966200 e rs9468925 ($r^2 = 0,04$) (104). Na etapa de validação, os resultados para os SNPs rs11966200 e rs9468925 foram replicados em duas amostras populacionais independentes formadas por 5.910 casos e 5.153 controles chineses da etnia *Han*, e 713 casos e 824 controles chineses da etnia *Uygur*. Os autores discutiram a possibilidade da associação do rs11966200 está sendo influenciada pela associação detectada para os alelos *HLA-A*3001*, *HLA-B*1302*, *HLA-Cw*0602* neste estudo (104) e correlacionam os seus resultados com achados anteriores já publicados entre HLA e vitiligo em população chinesa (175).

Em uma segunda etapa desse estudo, 17 SNPs que apresentaram $P < 1 \times 10^{-4}$ no estudo inicial e localizados fora da região MHC, bem como 15 SNPs adicionais que mostraram forte associação no estudo de Han e cols. (176) foram replicados em 4.443 casos e 5.260 controles chineses da etnia Han. Dois *loci* atingiram significância estatística: o primeiro na região cromossômica 6q27, representado pelos SNPs rs2236313 ($P = 2,63 \times 10^{-9}$; OR = 1.19) e rs6902119 ($P = 9,09 \times 10^{-8}$; OR = 1.17), e o segundo intragênico ao gene *ZMIZ1* localizado no cromossomo 10q22

(rs11593576, $P = 5,01 \times 10^{-3}$; OR = 0.90), cuja significância foi sugestiva de associação. Esses achados foram replicados em duas populações independentes de chineses da etnia Han e *Uygur*. Os dois SNPs associados na região 6q27 estão localizados a 200 kb do bloco de DL que contém os genes *RNASET2*, *FGFR10P*, *CCR6*, sendo este último previamente associado no GWAS realizado por Jin e cols. (173).

O principal sinal de associação detectado nos três GWAS já realizados para o vitiligo foi para marcadores da região MHC no cromossomo 6p21.3, tanto em populações caucasianas quanto em chinesas. Porém, os marcadores associados foram diferentes entre as populações. Na população caucasiana, sinal de associação independente foi detectado para a região de classe I, representado pelo *HLA-A2*, e na região de classe II, principalmente entre *HLA-DRB1* e *HLA-DQA1*, em desequilíbrio de ligação com *HLA-DR4*. Esses resultados são consistente com as associações previamente descritas entre vitiligo e *HLA-A2* (Liu et al, 2007) e *HLA-DR4* (Fain et al, 2006). Em contraste, na população chinesa, o sinal de associação foi para a região classe III, embora também existam algumas evidências para associação independente com a região classe I. Embora este efeito possa ser explicado pela heterogeneidade nos padrões de DL e haplótipos entre as populações chinesas e européias, sua real causa permanece desconhecida. Finalmente, é importante notar que a maioria dos sinais de associação detectados nos GWAS para o vitiligo são para genes envolvidos em vias de regulação autoimune, e com exceção dos genes *HLA* e *PTPN22*, nenhum dos genes detectados foram previamente descritos nos estudos clássicos de associação do tipo caso-controle e baseado em famílias.

1.7. GENES CANDIDATOS

1.7.1. Butirilcolinesterase (*BCHE*)

A Butirilcolinesterase (BChE), também conhecida como pseudocolinesterase, é um dos tipos de colinesterase presentes no sangue humano; a enzima é

codificada pelo gene *BCHE*, que contém quatro éxons e está mapeado na região cromossômica 3q26.1 (177).

A BChE é uma esterase produzida pelo fígado e amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, substância branca do cérebro e coração. Além disso, ensaios de imunofluorescência demonstraram *in situ* e *in vitro* que a BChE está presente na epiderme humana, queratinócitos e melanócitos (58).

Foram identificadas, através de eletroforese, cinco formas moleculares da BChE presentes no plasma humano (178) que, por ordem de peso molecular, foram denominados: C₁ (monômero), C₂ (monômero ligado à albumina), C₃ (dímero), C₄ (tetrâmero) e C₅ (tetrâmero ligado à uma substância desconhecida). As formas moleculares C₁-C₄ estão presentes em todos os indivíduos e a forma C₅ está presente em aproximadamente 10% dos caucasianos (179). O complexo C₅ é formado pela interação dos genes *BCHE* e *CHE2**C5, sendo este último mapeado na região cromossômica 2q33-q35.

Apesar de sua função fisiológica não ter sido completamente esclarecida, a BChE desempenha um papel na hidrólise de ésteres de colina, utilizando a butirilcolina como substrato preferencial. Variação genética afetando a atividade plasmática da BChE foi inicialmente descrita através de estudos que observaram que pessoas homozigotas sofrem apnéia prolongada após administração de dose padrão do relaxante muscular suxametônio (180). Correlação entre atividade da BChE, peso e IMC foram encontradas, sugerindo uma provável função dessa enzima no metabolismo de lipídios (179, 181-183). Além disso, evidências do envolvimento da BChE na doença de Alzheimer e resposta a agentes xenobióticos já foram descritos (184-186). Interessantemente, variante genética do gene *BCHE* foi recentemente descrita em associação com Hanseníase em uma amostra populacional brasileira (187).

No contexto do vitiligo, imunofluorescência *in situ* demonstrou que a expressão da proteína e atividade da enzima BChE está significativamente diminuída na pele de pacientes com vitiligo ativo quando comparado a pele controle saudável (58).

A atividade da BChE pode ser influenciada por diversos eventos, genéticos e ambientais. Aumento da atividade plasmática da BChE foi encontrado em obesidade, diabetes mellitus, nefrite, psoríase, hipertensão, hipertireoidismo e pacientes hiperlipêmicos sem obesidade (188). Entre os principais fatores genéticos, envolvidos na diminuição da atividade, estão variantes do gene *BCHE*, podendo estar relacionadas com alterações de síntese, degradação acelerada das moléculas circulantes ou ainda perda de afinidade pelos substratos. A presença da variante genética *BCHE K*, hoje caracterizada como um SNP (rs1803274), foi relacionada com a redução de 33% da atividade da enzima quando comparada com a enzima usual, (189). A frequência da variante *K* na população euro-brasileira é de 18.4% (190). Existem relatos associando a variante *K* do gene *BCHE* com aumento do risco para diabetes tipo 2 (191) e doença coronariana (192).

1.7.2. Genes de Interesse para Replicação

1.7.2.1. *TNF receptor superfamily, member 6 (FAS)*

Fas, também conhecido como TNFRSF6/CD95/APO-1, é um receptor de superfície celular, membro da família de receptores TNF, que apresenta três domínios extracelulares ricos em cisteína, que funciona como um sítio de reconhecimento, e um domínio funcional intracelular de 80 aminoácidos conhecido como domínio de morte (DD, em inglês *death domain*). Esse receptor é expresso na superfície dos linfócitos T e B ativados e em outros tipos de células normais e malignas (193, 194). O gene *FAS* humano está mapeado na região cromossômica 10q24.1 e possui nove exons.

A proteína Fas, através da via extrínseca de sinalização, inicia uma cascata de estímulos que leva à morte por apoptose em vários tipos celulares (194). Esse processo inicia-se com a interação do receptor Fas ao seu ligante FasL e, através do domínio intracelular DD, ocorre a formação de um complexo multiprotéico de sinalização e indução de morte celular, o DISC (em inglês, *death-inducing signaling complex*), pelo recrutamento da molécula adaptadora FADD (em inglês, *Fas associated DD*), que por sua vez ativa a caspase 8. É importante ressaltar que a via

de receptor de morte difere dependendo do tipo celular. Nas células T, por exemplo, caspase 8 ativa caspase 3 levando à apoptose, enquanto que em hepatócitos, existe a liberação de citocromo c, pela via mitocondrial, que é ativado, seguido da formação de apoptosomo, que juntos com pró-caspase 9, ativa caspase 3 (195, 196). Caspase 3 ativada cliva uma variedade de substrato, incluindo enzimas de reparo do DNA, proteínas estruturais celulares e nucleares, endonucleases entre outros constituintes celulares. Além disso, caspase 3 tem a habilidade de ativar outras caspases, tais como a 6 e 7, resultando em uma amplificação da destruição celular e assegurando que a apoptose induzida por Fas seja completamente executada (194).

FasL-Fas apresenta um papel crucial na modulação da apoptose e um importante papel na manutenção da homeostase do sistema imune, particularmente, na ativação da morte celular induzida de linfócitos periféricos ativados após a eliminação do antígeno e na seleção negativa de timócitos no timo. A homeostase das células B, também parece ser regulada pela interação FasL-Fas (197).

As primeiras evidências de que a falha da morte celular por apoptose poderia resultar em autoimunidade foi detectada em camundongos que portavam mutações homocigotas do gene *FAS* ou *FASLG* (gene que codifica proteína ligante Fas). Esses camundongos desenvolveram uma síndrome linfoproliferativa com características semelhantes ao LES em humanos, com múltiplos autoanticorpos e nefrite. A linhagem de camundongos *lpr/lpr* (de linfoproliferação) possui um defeito na expressão do gene *FAS* e produz baixos níveis de proteína Fas, e a linhagem *gld/gld* (de doença linfoproliferativa generalizada) apresenta uma mutação pontual no gene *FASLG* que resulta na produção de uma proteína inativa, interferindo na sua função sinalizadora (198).

Para o vitiligo, a morte por apoptose dos melanócitos via Fas não está bem esclarecida. Recente achado demonstrou que destruição dos melanócitos pelas células T CD4⁺ é parcialmente inibida pelo bloqueio da interação Fas-FasL em um modelo animal de vitiligo autoimune (199). Já observações *in vitro*, indicam que os melanócitos são insensíveis à morte celular mediada pela ligação de Fas ao seu ligante (51). Além disso, análise imunohistoquímica de 10 pacientes afetados com vitiligo demonstrou uma expressão anormal de FasL na epiderme despigmentada quando comparada com a epiderme de normal pigmentação (200).

Foi reportado que dois polimorfismos na região promotora do gene *FAS* – substituições G>A na posição -1377 (rs2234767) e A>G na posição -670 (rs 1800682) – destroem o elemento de ligação para a proteína estimuladora 1 (SP1), transdutora de sinal, e ativadora de transcrição de proteína 1 (STAT1), respectivamente, diminuindo assim a atividade do promotor e diminuindo a expressão de *FAS* (201, 202). Diversos estudos têm demonstrado que polimorfismos no gene *FAS* estão associados com um aumento de risco a doenças autoimune, incluindo síndrome de Sjogren's (203), Lúpus Eritematoso sistêmico (204), hepatite autoimune (205) e Síndrome de Guillain-Barré (206).

Atualmente resultados contraditórios entre associação do gene *FAS* e vitiligo tem sido obtidos. Polimorfismo do gene *FAS* foi associado ao aumento de risco do vitiligo em chineses da etnia Han. Estudo de associação caso-controle realizado por Li e cols., envolvendo 750 pacientes afetados com vitiligo e 756 controles saudáveis encontrou associação estatisticamente significativa entre o alelo "A" do rs2234767 e vitiligo $P = 0,006$; OR 1,35 (95% CI 1,09 – 1,66) (141). Posteriormente, Birlea e cols., investigaram o papel de polimorfismos do gene *FAS*, bem como de outros genes previamente associados com o vitiligo, em um estudo envolvendo 1392 casos e 2629 controles, ambos brancos e não hispânicos, e não foi detectada evidência de associação entre o polimorfismo rs2234767 e vitiligo ou com qualquer outro dos 30 SNPs cobrindo a região do gene *FAS* (chr10:90,740,288-90,780,541) (116).

1.7.2.2. Catecol-O-Metiltransferase (*COMT*)

A Catecol-O-Metiltransferase (*COMT*) é uma das principais enzimas envolvidas na degradação metabólica das catecolaminas. Essa enzima catalisa a transferência de um grupo metil da S-adenosil-metionina (SAM) para as catecolaminas. Em humanos, o gene que codifica a proteína *COMT* está mapeado na região cromossômica 22q11.1-q11.2 (207) e codifica duas principais isoformas bem caracterizadas da proteína, com diferença na afinidade pelo seu substrato. Na maioria dos tecidos analisados, a isoforma citoplasmática solúvel (S-*COMT*) predomina, enquanto que no cérebro encontra-se a forma ligada à membrana (MB-

COMT) (208). A diferença entre S-COMT e MB-COMT reside em um grupamento N-terminal.

A COMT desempenha um papel central no metabolismo de drogas – como por exemplo, as usadas no tratamento de hipertensão, asma e doença de Parkinson – e neurotransmissores (dopamina, epinefrina e norepinefrina) (148). Além disso, foi reportado que a COMT é importante para prevenir a formação de quinonas tóxicas durante a síntese de melanina (209). Li e cols. relatam que expressão anormal da proteína COMT pode resultar em acúmulo de substâncias tóxicas e, subsequentemente, dano ao microambiente do melanócito, resultando no vitiligo (139). Foi ainda demonstrado que pacientes com vitiligo expressam níveis mais altos de COMT quando comparados a controles sem a doença (210). O aumento de catecolaminas na urina de pacientes com vitiligo não-segmentar foi observado na fase ativa da doença, em relação ao grupo controle (64, 211). É importante mencionar que Liang e cols. reportaram evidência de ligação entre o locus 22q12 e vitiligo em famílias chinesas (103).

Foi reportado que o polimorfismo no códon 158 G>A (rs4680) localizado no exon 4 do gene *COMT* acarreta na substituição de valina por metionina na proteína, resultando na mudança da atividade da enzima (27). A valina na posição 158 resulta na proteína termoestável (*heat-stable*) e a variante COMT de alta atividade (H) é formada; já a metionina nesta posição resulta na proteína termolábil (*heat-labile*) e na variante de baixa atividade (L) (27).

Tursen e cols. observaram associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo rs4680 e pacientes com vitiligo acrofacial, em estudo de associação, envolvendo 50 casos e 66 controles, ambos turcos. (148). Anos mais tarde, Li e cols. realizaram estudo de associação com 749 casos e 763 controles chineses da etnia Han e encontraram evidência de associação entre o rs4680 e vitiligo, sendo que a associação foi mais pronunciada nos pacientes com idade de início da doença precoce e presença de história familiar. Quando os autores estratificaram os pacientes por forma clínica do vitiligo, o sinal de associação se manteve para os pacientes com vitiligo vulgar, focal e universal, no entanto, nenhuma associação foi observada para os pacientes com vitiligo acrofacial e segmentar (139). Recentemente, Birlea e cols. investigaram o papel de polimorfismos do gene *COMT*,

bem como de outros genes previamente associados com o vitiligo, em estudo envolvendo 1392 casos e 2629 controles, ambos brancos e não hispânicos, e não foi detectada evidência de associação entre o polimorfismo rs4680 e vitiligo ou com qualquer outro dos 20 SNPs cobrindo a região do gene *COMT* (116).

O SNP rs4680 tem sido associado com doenças psiquiátricas (212), doença de Parkinson (213) e percepção da dor (214).

1.7.2.3. Endotelina-1 (*EDN1*)

O gene endotelina-1, *EDN1*, contém 5 exons e está localizado na região cromossômica 6p23-p24, próxima ao *locus* 6p21-p22 reportado previamente em ligação com vitiligo em uma população chinesa (103). A endotelina-1 é produzida por várias células somáticas, incluindo queratinócitos (215).

As endotelinas (ETs) pertencem à família de peptídeos de sinalização que incluem três membros, ET1, ET2 e ET3, os quais são compostos por 21 resíduos de aminoácidos. A ET1 foi o primeiro membro da família ET descrito, sendo caracterizado como potente vasopressor, derivados das células endoteliais vasculares (Yanagisawa et al, 1988). Entre os principais fatores parácrinos que estão envolvidos na biologia dos melanócitos, as ETs desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento precoce dessas células, em sua resposta à radiação ultravioleta, e em condições patológicas, incluindo melanoma. Foi descrito que defeitos na ET3 ou em seu receptor *EdnrB* resulta em perda dos melanócitos. Mutações e deleções dos genes *EdnrB* e *Edn3* em camundongos resulta em fenótipo de piebaldismo letal (*sl*) e *lethal spotting* (*ls*). Camundongos carregando a mutação *sl* são brancos, exceto manchas nas regiões da cabeça e nádegas (Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994).

A ET1 desempenha um papel nos melanócitos maduros, induzindo a melanogênese pela ativação da tirosinase e aumentando os níveis de TRP-1. A ET1 também leva à proliferação de melanócitos e promove a formação de dendritos. Cultura de queratinócitos sintetiza e secreta ET1 e a irradiação ultravioleta estimula a produção ET1 pelos queratinócitos. A ET1 pode também cooperar sinergicamente

com outros fatores de crescimento/citocinas a fim de exercer maior influência sobre os melanócitos (40).

Os estudos de associação entre variantes do gene *EDN1* e a suscetibilidade ao vitiligo geraram resultados conflitantes. O primeiro estudo de associação para o gene *EDN1*, usando como fenótipo vitiligo, foi realizado por Kim e cols., envolvendo 312 casos e 313 controles saudáveis, não encontrou diferença significativa na distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos rs2071942 e rs5370 do gene *EDN1* entre os casos e controles. No entanto, as frequências dos haplótipos formados com os alelos G/A do marcador rs2071942 e G/T rs5370 diferiram de forma significativa entre os pacientes afetados com vitiligo e controles ($P < 0,0001$) (134). Quando os autores analisaram os haplótipos estratificando a população de acordo com a forma clínica da doença (vitiligo focal, segmentar e generalizado), a associação foi observada para as formas de vitiligo focal e segmentar, levando os autores a concluir que a patogênese do vitiligo é diferente entre as diferentes formas clínica da doença. Em contrapartida, Lan e cols. não encontraram evidência significativa de associação entre a frequência dos polimorfismos rs2071942 e rs5370 do gene *EDN1* e a ocorrência de vitiligo em estudo de associação caso-controle envolvendo 51 pacientes e 118 controles (216). Recentemente, Birlea e cols. investigaram 30 SNPs abrangendo a região do gene *EDN1*, incluindo o rs5370, em 1392 casos e 2629 controles e nenhum sinal de associação foi detectado (116).

A ET1 tem sido implicado em várias doenças, incluindo hipertensão (217), arteriosclerose (218), arritmia maligna (219) e insuficiência cardíaca crônica (220).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O vitiligo é um problema para a saúde e bem estar de milhões de pessoas, em especial, devido ao seu alto potencial de estigmatização. Como a fisiopatologia do vitiligo ainda não está completamente elucidada e é em parte controlada por um significativo componente genético, entendemos que esforços no sentido de se identificar os genes e as variantes genéticas envolvidas contribuirão de forma crítica para um maior entendimento da patogênese da doença, podendo levar, a médio e longo prazo, a melhores estratégias de diagnóstico e tratamento.

Estudos anteriores indicam natureza complexa do componente genético no controle da suscetibilidade ao vitiligo. Nossa hipótese é que polimorfismos dos genes *FAS*, *COMT*, *EDN1* (previamente associados à ocorrência de vitiligo) e *BCHE* estejam envolvidos no controle da suscetibilidade à doença em uma população sul-brasileira. A escolha desses genes é justificada pelo fato de que: (i) existem múltiplas evidências *in vitro* e *in vivo* do envolvimento do estresse oxidativo por H_2O_2 na patogênese do vitiligo, envolvendo uma cascata de eventos metabólicos e de sinalização na epiderme e também no sistema vascular dos afetados, incluindo perturbação na homeostase de catecolaminas (55). Foi demonstrado que os melanócitos cultivados das bordas das lesões de pacientes com vitiligo apresentavam aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo (56). Em pacientes com vitiligo, a expressão da proteína e atividade da enzima BChE está significativamente diminuída (58). Nenhum estudo investigando variantes genéticas do gene *BCHE* e correlação com a atividade enzimática foi realizado para o vitiligo (iii) há a necessidade de replicar de forma independente a associação genética descrita em estudos anteriores para os genes *FAS*, *COMT* e *EDN1*, para os quais iniciativas anteriores de replicação de sinais positivos de associação geraram resultados conflitantes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é aplicar estratégia de análise de associação para investigar a participação de polimorfismos dos genes candidatos no controle da suscetibilidade ao vitiligo e suas variáveis clínicas, em uma população sul-brasileira.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar polimorfismos do tipo *Tag* SNP do gene *BCHE* para associação com suscetibilidade ao vitiligo em uma amostra populacional composta por trios formados por indivíduos com vitiligo e seus pais, utilizando desenho baseado em famílias;
2. Investigar o impacto de variáveis não genéticas (idade de início da doença, presença de doença autoimune associada e forma clínica) sobre os eventuais sinais de associação observados entre variantes do gene *BCHE* e vitiligo;
3. No caso de evidência positiva de associação para o gene *BCHE* na amostra de trios, testar para replicação destes achados em uma amostra populacional caso-controle independente;
4. No caso de evidência positiva de associação para o gene *BCHE*, determinar a atividade da enzima BChE no plasma de pacientes selecionados de acordo com o genótipo para o marcador associado, buscando-se caracterizar correlação genótipo/fenótipo entre os alelos associados e níveis plasmáticos da enzima;
5. Testar polimorfismos dos genes *EDN1*, *COMT* e *FAS* para replicação da associação previamente descrita com vitiligo em uma amostra populacional composta por trios formados por indivíduos afetados com vitiligo e seus pais, utilizando desenho baseado em famílias.
6. Investigar o impacto de variáveis não genéticas (idade de início da doença, presença de doença autoimune associada e forma clínica) sobre os eventuais

sinais de associação observados entre vitiligo e variantes dos genes *EDN1*, *COMT* e *FAS*.

4. MÉTODOS

4.1. DESENHO GERAL DO ESTUDO

O presente estudo é transversal, de ciência básica, que utiliza diferentes ferramentas de análise genética para dissecção adicional do componente genético controlando a suscetibilidade ao vitiligo. Em particular, foi utilizado um desenho que combina análise primária de associação baseada em famílias, seguida de análise caso-controle, visando à replicação dos resultados positivos, e de uma análise funcional de correlação genótipo-fenótipo, caso pertinente. A figura 1 apresenta um fluxograma do desenho geral do estudo.

4.2. AMOSTRA POPULACIONAL PARA O ESTUDO GENÉTICO

Este estudo foi realizado utilizando uma amostra populacional previamente recrutada, durante o período 2004-2007, para fins de estudos epidemiológicos e análise genética de suscetibilidade ao vitiligo. Os indivíduos afetados, seus pais e controles independentes foram recrutados no sul do Brasil, nos estados do Paraná e Santa Catarina, e foram avaliados por único médico dermatologista com ampla experiência no tratamento de vitiligo, em consultório particular de dermatologia e no serviço de dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. Para determinar a presença de vitiligo, todos os indivíduos foram submetidos a exame clínico de todo o tegumento e através de exame de lâmpada de Wood. Quando necessário, a confirmação diagnóstica de vitiligo foi obtida através de biópsia e exame histopatológico. Após o diagnóstico, todos os casos confirmados responderam a um questionário informando dados demográficos e clínicos como: sexo, idade de início do vitiligo (autorelato da data que foi observada a primeira mancha branca), presença de história familiar de vitiligo e ocorrência de doença autoimune no núcleo familiar (entre pais e irmãos do indivíduo afetado).

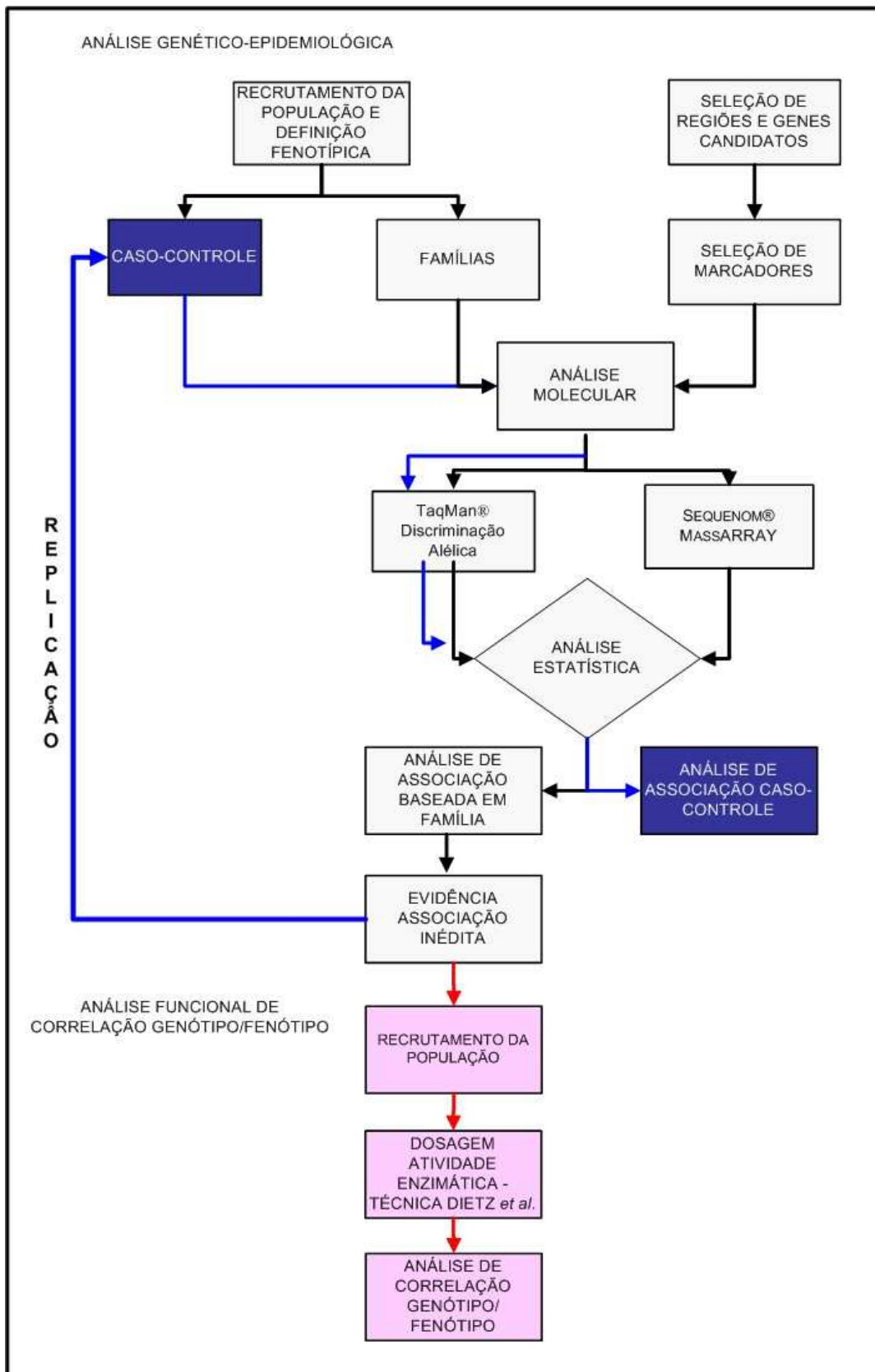


Figura 1: Desenho geral do estudo.

Todos os procedimentos diagnósticos empregados neste estudo são amplamente consagrados na literatura especializada e não oferecem riscos ao paciente além daqueles descritos no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1). Todos os candidatos foram solicitados a ler o TCLE, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCPR. A aprovação do estudo pelo CEP encontra-se no anexo 3. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo foram solicitados a assinar o TCLE. Caso o voluntário fosse menor de idade, um formulário próprio foi apresentado e assinado por um dos pais ou guardião legal.

4.2.1. Amostra Populacional de Famílias

Para a análise de associação baseada em famílias, foram incluídos neste estudo 600 indivíduos distribuídos em 189 famílias nucleares formadas por indivíduos afetados com vitiligo, independente de sua forma clínica, seus pais e familiares, quando disponível. Essas famílias foram divididas em 173 famílias *simplex* independentes (formado por um indivíduo afetado e seus pais) e 16 famílias *multiplex* (formadas por dois ou mais membros afetados). Ao todo, 212 trios puderam ser derivados desta amostra populacional.

4.2.2. Amostra Populacional Caso-controle

Para compor a amostra populacional caso-controle de replicação, foram recrutados, paralelamente à população de famílias outros 134 indivíduos independentes com vitiligo *per se* para compor o grupo de casos, usando os critérios de diagnóstico e recrutamento descrito no item 4.2.. Para compor o grupo controle, foram incluídos 134 indivíduos pareados com os casos de acordo com idade e sexo, provenientes da mesma região geográfica. Critérios de elegibilidade para o grupo controle foram: ausência de autorelato de história pessoal ou familiar de doenças autoimune e inflamatórias crônicas, bem como ausência de sinais de vitiligo após completo exame físico realizado por médico dermatologista experiente.

As principais características demográficas e clínicas dos 224 indivíduos afetados com vitiligo recrutados para o estudo baseado em famílias (que inclui os 212 filhos afetados que compuseram os trios, mais seus pais, quando afetados) e dos 134 indivíduos que compõem o grupo de casos para o estudo caso-controle foram publicadas anteriormente (73) (anexo 5). As doenças autoimunes mais frequentes associadas com vitiligo na presente amostra populacional foram: doença autoimune da tireóide, psoríase e halo-nevus.

4.2.3. Critérios de Inclusão

- Diagnóstico de vitiligo confirmado e a doença classificada por médico dermatologista, através de exame clínico de rotina, conforme protocolo de diagnóstico de vitiligo;
- Diagnóstico de vitiligo confirmado por biópsia incisional e exame histopatológico, quando não foi possível confirmação por exame clínico;
- Ausências de síndromes que apresentam vitiligo entre suas manifestações, tais como: síndrome Vogt-Koyanagy Harada e síndrome de Waardenburg;
- Concordância em participar do estudo e assinar o TCLE.

4.2.4. Critérios de Exclusão

- Famílias para as quais inconsistências de transmissão mendeliana foram encontradas durante a análise genética;
- Amostras para as quais não foram obtidos DNA em qualidade suficiente para a amplificação por PCR e análise molecular.

4.3. AMOSTRA POPULACIONAL PARA O ESTUDO FUNCIONAL

Para compor a amostra populacional do estudo funcional de correlação genótipo/fenótipo, foram selecionados 49 indivíduos que participaram do estudo genético, previamente descrito no item 4.2 e que atenderam os seguintes critérios de inclusão:

- Ser afetado por vitiligo;
- Ter sido genotipado para o marcador rs1803274 do gene *BCHE*;
- Estar disponível para contato e novo convite para participação do estudo;
- Concordar em participar e assinar o TCLE.

Os indivíduos foram selecionados de acordo com o genótipo do marcador rs1803274 do gene *BCHE*, e as principais características demográficas e clínicas dos indivíduos selecionados encontram-se na tabela 3. Todos os pacientes responderam a um questionário (anexo 4) informando sobre a presença de algum evento ou doenças já descritos na literatura que possam interferir na atividade da enzima em estudo. Todos os candidatos foram solicitados a ler o TCLE, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCPR, anexo 2. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo foram solicitados a assinar o TCLE. Caso o voluntário fosse menor de idade, um formulário próprio foi apresentado e assinado por um dos pais ou guardião legal.

Tabela 3: Características demográficas e clínicas dos indivíduos selecionados para estudo funcional

Característica	Genótipo rs1803274		P-Valor
	AA+AG (n=24)	GG (n=25)	
Gênero n (%)			
Masculino	16 (66,7 %)	9 (36 %)	0,032
Feminino	8 (33,3 %)	16 (64 %)	
Idade de Início do Vitiligo			
Média (anos)	22,54 ± 9,6	21,88 ± 11,36	
Doença Autoimune n (%)			
Presença	6 (25 %)	10 (40 %)	0,26
Ausência	18 (75 %)	15 (60 %)	
Forma Clínica n (%)			
Segmentar	4 (16,7 %)	2 (8 %)	0,42*
Não-Segmentar	20 (83,3 %)	23 (92 %)	

*Teste Fisher

Os critérios de exclusão para o estudo de correlação genótipo/fenótipo:

- Indivíduo portador de diabetes *melittus*;
- Paciente no último trimestre de gestação;
- Indivíduo com índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 ;
- Indivíduos que tenham relatado histórico de manipulação de agrotóxicos.

4.4. COLETA DO MATERIAL, EXTRAÇÃO DO DNA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS

O DNA utilizado nas análises foi obtido a partir de sangue total. Foram coletados 5 ml de sangue por punção venosa em tubos do tipo vacuotainer® contendo EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) como anticoagulante, em condições ideais de assepsia. O sangue coletado foi centrifugado e a camada leucocitária (*buff coat*) separada para extração do DNA, segundo o protocolo para extração rápida do DNA genômico proposto em (221). Brevemente, a camada leucocitária foi tratada com solução tampão TKM1 e detergente não-iônico Igepal, para romper as membranas eritrocitárias. Em seguida, foi adicionado ao *pellet* a solução tampão TKM2 e o detergente aniônico SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) para lise dos leucócitos e completa liberação do DNA. Após incubação de 24 horas, foi adicionada a solução de Cloreto de Sódio 6 M, para a precipitação de proteínas e o sobrenadante resultante foi utilizado para precipitação do DNA em etanol absoluto. O DNA precipitado foi transferido, livre de etanol, para um tubo tipo eppendorf limpo e em seguida lavado com etanol a 70% e seco por duas horas em estufa a 37°C. O *pellet* de DNA resultante foi finalmente ressuspensionado em tampão TE e armazenado a -20°C.

O DNA extraído foi submetido à leitura por espectrofotometria para verificar a concentração da amostra. O método espectrofotométrico empregado tem como princípio a absorção seletiva de luz ultravioleta de 260 nm de comprimento de onda pelo DNA, enquanto que proteínas absorvem seletivamente luz em 280 nm. Portanto, a leitura da solução nestes dois comprimentos de onda permite a

quantificação tanto de DNA quanto de proteínas presentes na amostra extraída. A absorbância (A) encontrada em 260 nm é utilizada no cálculo da concentração de DNA, e a razão A260/A280 indica o grau de pureza da amostra.

Para determinar a concentração e pureza do DNA obtido, as amostras foram diluídas 1:200 (1 parte da solução DNA para 200 partes de água milli-Q). Em seguida, foi medida a absorbância em 260 nm e 280 nm, e calculada tanto a concentração de DNA, com base nas leituras a 260 nm, quando a razão A260/A280. Valores entre 1,8 e 2,0 para a razão A260/A280 indicam boa concentração e pureza da amostra, com maior proporção de DNA em relação às proteínas.

Após a determinação da concentração, as amostras foram diluídas na concentração final de 20 ng/μl, para solução de trabalho, e armazenadas em freezer a -20°C de acesso restrito e permitido apenas aos pesquisadores envolvidos no projeto ou ao pessoal técnico por eles autorizado.

4.5. SELEÇÃO DOS GENES E MARCADORES CANDIDATOS

A seleção dos genes candidatos para este estudo foi realizada com base em dois critérios principais: (i) genes que foram descritos em associação com vitiligo em estudos prévios, desde que apresentassem um possível papel relevante na patogênese da doença e/ou estivessem localizados em *locus* previamente descrito em ligação com a doença, que ainda precisavam ser validados em populações com *background* distinto. Segundo esse critério, três genes candidatos foram selecionados: *COMT*, *EDN1* e *FAS*; e (ii) genes ainda não testados em estudos de associação, cuja função pudesse estar relacionada à patogênese da doença. Nesse contexto foi selecionado o gene *BCHE*.

Para os genes descritos acima foram selecionados marcadores do tipo Tag SNPs levando em consideração a estrutura de DL dos respectivos *loci*, conforme disponível no banco de dados público *HapMap*, além de dados como a validação por frequência e conteúdo de informação de cada marcador. Foram considerados marcadores independentes aqueles que, em análise pareada, apresentaram grau de DL inferior a 0,8, conforme estimado pelo parâmetro r^2 . Para validação por frequência, marcadores deveriam apresentar frequência alélica mínima (FAM) de

20%. Esses critérios foram avaliados para as populações Africana (YRI), Asiática (CHB e JPT, Chineses e Japoneses, respectivamente) e Européia (CEU), disponíveis no *HapMap*. O número total de marcadores foi definido pela extensão da região genômica sob investigação e cobertura total dos genes selecionados. No quadro 2 encontram-se os genes e marcadores selecionados para este estudo.

Região Cromossômica	Gene	dbSNP	Variação
3q26.1	<i>BCHE</i>	rs4680607	[G/T]
		rs9873779	[G/T]
		rs2668209	[A/G]
		rs1355538	[C/T]
		rs1799807	[A/G]
		rs1126680	[A/G]
		rs829503	[A/C]
		rs866164	[C/T]
		rs9883728	[A/T]
		rs1803274	[A/G]
6p24.1	<i>EDN1</i>	rs5370	[G/T]
		rs2071942	[A/G]
		2070699	[G/T]
10q24.1	<i>FAS</i>	rs2296603	[A/G]
		rs4406738	[A/T]
		rs2234978	[C/T]
		rs2234767	[A/G]
		rs7911226	[A/G]
22q11.21	<i>COMT</i>	rs4680	[A/G]
		rs933271	[C/T]

Quadro 2: Genes e marcadores candidatos.

4.6. ANÁLISE MOLECULAR

As genotipagens dos polimorfismos dos genes candidatos *BCHE* (exceto SNP rs1803274), *EDN1*, *FAS* (exceto SNP rs2234767) e *COMT* foram realizadas através plataforma de alto rendimento Sequenom® MassARRAY; as genotipagens dos polimorfismos rs1802374 na população de famílias e caso-controle, rs1355538 na população caso-controle e rs2234767 na população de famílias foram realizadas

através do sistema de discriminação alélica ABITaqMan, conforme implementado na plataforma 7500® de PCR em tempo real.

4.6.1. Análise Molecular - Genotipagem na Plataforma de Alto Rendimento Sequenom®

As genotipagens utilizando a plataforma de alto rendimento Sequenom® foram realizadas no laboratório da McGill University – *Génome Québec Innovation Centre*, Montreal – Canadá.

O sistema de genotipagem Sequenom® MassARRAY, usa o ensaio denominado de iPLEX. O ensaio iPLEX é baseado em uma amplificação inicial dos fragmentos genômicos em PCR multiplex. As reações foram realizadas em volume final de 5 ul contendo tampão *Sequenom* PCR, 2 mM de *Sequenom* MgCl₂, 0,5 mM de *Sequenom* dNTPs, *pool* de oligonucleotídeos iniciadores a 0,1 uM, 0,2 U/ul de *Sequenom* Enzima PCR, sob condições uniformes e universal de ciclagem para todos os SNPs. Após o PCR os amplicons foram tratados por 50 min, sob alternância de temperatura, com 0,150 U/ul da enzima SAP, a qual desativa os nucleotídeos livres que não foram incorporados à reação de PCR. Na sequência foi realizada a etapa SBE (em inglês, *single base extension*) que se baseia na incorporação de um nucleotídeo terminal com massa modificada. As reações de extensão foram realizadas em um volume final de 2 ul contendo *pool* dos oligonucleotídeos sondas 47% V, 1 mM de iPLEX *terminator*, tampão iPLEX e 0.655 U/ul de iPLEX *thermo sequence*. Os produtos resultantes da extensão das sondas foram tratados com 6 mg de resina (*clean resin*), a qual precipita os cátions presentes na reação e, então, o sobrenadante foi adicionado ao SpectroCHIP®. O chipe contendo o produto da extensão foi analisado no espectro de massa MALDI-TOF (em inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*). Os genótipos foram discriminados através da sua massa e analisado no *software* MassARRAY Typer 4.0.

4.6.2. Genotipagem Através do Sistema de Discriminação Alélica

As genotipagens utilizando o sistema de discriminação alélica ABITaqMan - plataforma 7500® de PCR em tempo real foram realizadas no Laboratório Experimental Multiusuário do PPGCS – PUCPR.

O sistema TaqMan de discriminação alélica é um ensaio no qual as variantes genômicas são detectadas através de uma PCR *multiplex*, que combina a amplificação e detecção do segmento polimórfico em um único passo. Isso ocorre devido à presença, na reação, de: (i) um par de oligonucleotídeos sonda, específicos para cada variante alélica, marcados com química fluorescente diferente (normalmente VIC™ e FAM™) e (ii) um *quencher* que captura a fluorescência do fluoróforo que está próximo fisicamente. Quando ocorre hibridização sonda/amplicon, a atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase leva à clivagem da sonda e liberação do fluoróforo, o qual emite fluorescência no comprimento de onda específico, que é detectado através de um conjunto de filtros. Os dados da intensidade de fluorescência são acumulados a cada ciclo da reação de PCR e só podem ser obtidos no final do processo, considerado como *end-point*.

As reações foram realizadas em termociclador modelo *ABI Prism 7500* (Applied Biosystems) em um volume final de 5 µL contendo 20 ng de DNA genômico, reagente Assay 40X em concentração final de 1X contendo oligonucleotídeos iniciadores e sondas marcadas com os fluoróforos VIC™ e FAM™ alelo específico em concentrações ideais e TaqMan *Genotyping PCR Master Mix*, o qual contém Gold Taq Polimerase com atividade de 5' DNase, dNTP's e tampão a base MgCl₂. Todos os reagentes foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems).

O ensaio de discriminação alélica envolve as seguintes etapas:

- 1- Pré-leitura: as reações foram submetidas a uma pré-leitura a 60°C por 1 minuto, a fim de detectar o *background* da fluorescência associada com os oligonucleotídeos iniciadores e sondas antes da amplificação.
- 2- Reação de amplificação: consistia em uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos para inativação da enzima AMPERASE e 95°C durante 10 minutos

para a desnaturação inicial. Em seguida as amostras foram submetidas a 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, durante o qual ocorre a hibridização dos oligonucleotídeos e a extensão dos fragmentos.

3- Pós-leitura: as reações são submetidas a uma pós-leitura a 60°C por 1 minuto, a fim de subtrair o *background* coletado na pré-leitura do valor final obtido na pós-leitura.

4- Interpretação dos resultados: nos indivíduos homocigotos, ocorre à hibridização com uma das sondas alelo-específica VICTM ou FAMTM, sendo somente detectada a fluorescência no comprimento de onda de um dos fluoróforo, dependendo para qual alelo o indivíduo é homocigoto. Nos indivíduos heterocigotos, ocorre à hibridização com ambas as sondas alelo-específicas VICTM e FAMTM, e as sondas apresentam intensidade de fluorescência equivalentes para os alelos, sendo detectadas em ambos os comprimentos de onda dos fluoróforos em questão.

4.7. DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE

A determinação da atividade enzimática da enzima BChE foi realizada pelo método descrito por Dietz e cols. modificado, utilizando-se o Kit Colinesterase do fabricante Doles. O princípio da técnica é a hidrólise da propioniltiocolina pela colinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando o composto o 5-tio-2-nitrobenzoato, de cor amarela (222).

Para dosagem da enzima BChE, inicialmente foi incubado em banho-maria por 3 minutos a 37°C 0,5 ml de substrato (Iodeto de Propioniltiocolina) e 1,5 ml do reagente de cor (solução de 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico em tampão de fosfato pH 7,6). Após esse período foi adicionado 10 uL do plasma do paciente e incubado por 2 minutos e 30 segundos sob a mesma temperatura. Finalizado o tempo de incubação, ainda no banho-maria, foi adicionado 1,5 ml da solução inibidora (solução de sulfato de quinidina 0,5%). Juntamente ao tubo teste do paciente é realizado um tubo branco. A dosagem do produto formado foi realizada em

espectrofotômetro ajustado em 410 nm, acertando o zero com o branco. Para cada paciente, a dosagem da atividade enzimática foi realizada em triplicada.

Anterior ao início da dosagem da atividade enzimática e para cada kit utilizado foi realizada a determinação do fator padrão, o qual foi utilizado para calcular a concentração de butirilcolinesterase, em U.I./mL, no plasma dos pacientes.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de associação genética baseada em famílias entre os marcadores testados e suscetibilidade ao vitiligo foi realizada através de teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), para os modelos dominantes e aditivos, conforme implementado no *software* FBAT (223). Análise haplotípica, usando o comando hbat, também foi realizada no *software* FBAT. Além disso, os alelos dos marcadores dos genes candidatos mostrando evidência para associação foram analisados novamente por regressão logística condicional, estratégia que permite verificar a influência dos fatores ambientais juntamente aos fatores genéticos, assim como estimar o “odds ratio” (OR) e os intervalos de confiança (CI), utilizando o comando phreg, conforme implementado no *software* SAS, versão 9.1 (SAS institute, Cary, North Carolina, USA). Para análise de associação genética baseada em populações (caso-controle) foi realizada análise univariada sob os modelos dominantes e aditivos, conforme implementada no *software* SPSS 13.0.

O teste para verificar se as frequências alélicas dos SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como a estimativa do grau de DL entre alelos de pares de marcadores usando o parâmetro r^2 , foram realizados utilizando o *software* Haploview 4.1 (224).

Para a comparação dos níveis plasmáticos da BChE nos diferentes genótipos foi realizada a análise de associação paramétrica usando o teste t de Student, sob um modelo dominante, conforme implementado no *software* SPSS 13.0.

5. RESULTADOS

5.1. BUTIRILCOLINESTERASE (*BCHE*)

5.1.1. Análise de Associação Baseada em Famílias do Gene *BCHE* com Vitiligo

Foram testados 10 SNPs, intragênicos ao gene *BCHE*, para associação com vitiligo. As frequências alélicas dos SNP testados estavam em HWE, exceto para o alelo do marcador rs4680607, para o qual a análise apresentou um valor marginal de significância estatística ($P = 0,06$). Análise de DL incluindo todos os SNPs testados para o gene *BCHE* revelou que todos os 10 SNPs são *tags* independentes, segundo o critério de $r^2 < 0,8$, conforme demonstrado na figura 2. No entanto, uma análise mais cuidadosa revela algum grau de DL, não desprezível, entre certos marcadores; por exemplo, o rs2668209 apresentou um DL intermediário de $r^2 = 0,54$ com o rs4680607, e $r^2 = 0,5$ com o rs1803274.

Análise de associação baseada em famílias realizada para os 10 SNPs revelou associação estatisticamente significativa para os alelos “C” do rs1355538, “T” rs4680607 e “A” rs2668209, todos conferindo suscetibilidade ao vitiligo nas famílias analisadas. O alelo “A” do rs1803274 confere proteção ao vitiligo nas mesmas famílias (tabela 4). Os demais SNPs testados para o gene *BCHE* não mostraram associação estatisticamente significativa com o vitiligo na amostra populacional testada.

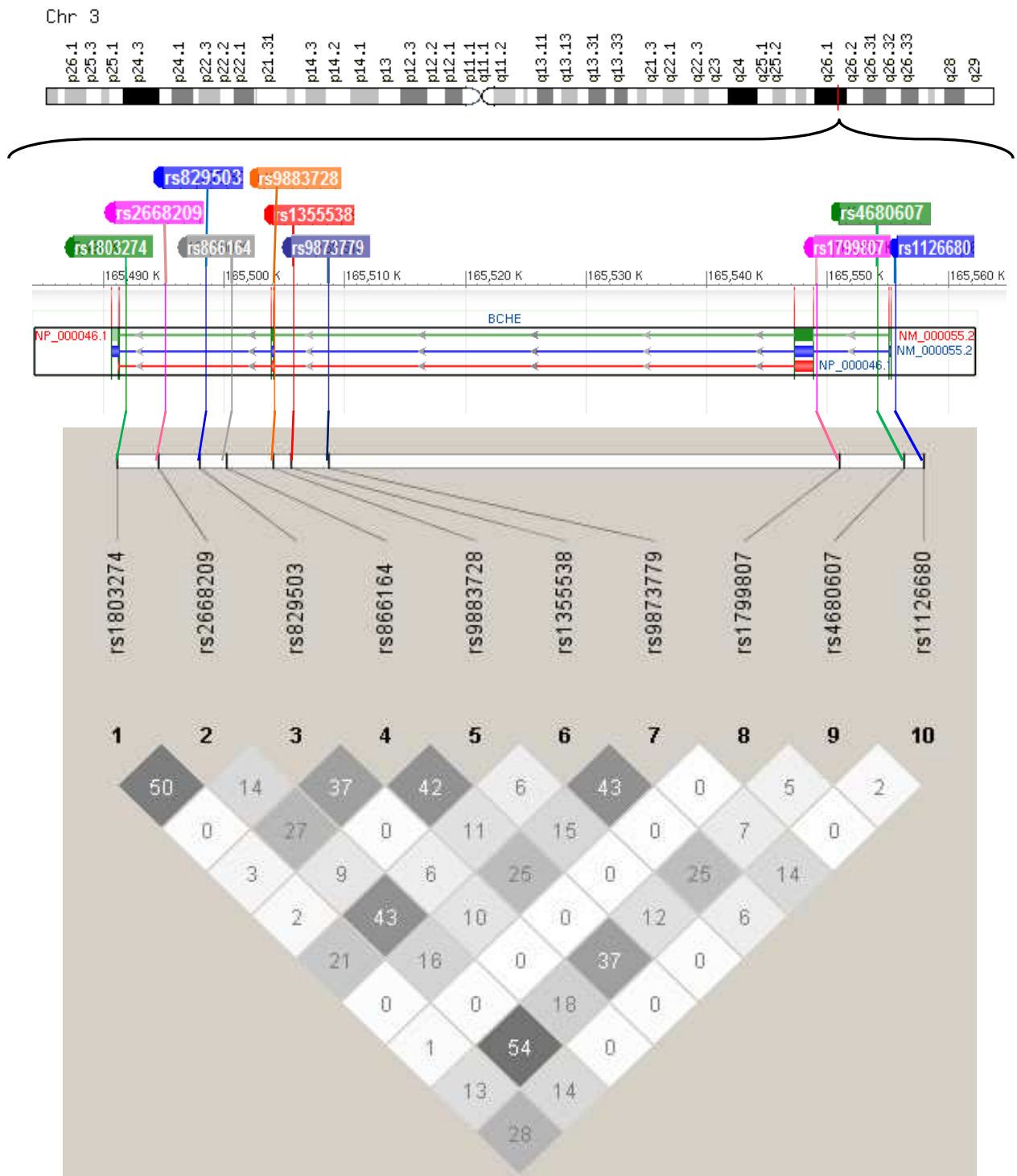


Figura 2: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *BCHE*. Os números no interior dos quadrados indicam a proporção de DL, em %, calculado utilizando-se o parâmetro r^2 ; o código de cores reflete a intensidade de DL entre dois *loci*: quanto mais escuro o quadrado, maior o DL entre os SNPs.

Tabela 4: Análise de associação baseada em famílias entre o gene *BCHE* e vitiligo

<i>BCHE</i>	rs2668209	rs4680607	rs1803274	rs1355538
DL				
Alelo Referência	A	T	A	C
Frequência Alélica	0,68	0,77	0,2	0,47
Nº Famílias Informativas	48	28	97	87
FBAT (<i>P</i> - valor)*	0,05	0,03	0,03	0,006
Univariada OR (95% CI)	1,93 (0,97 - 3,83)	2,77 (1,04 - 7,43)	0,70 (0,49 - 0,98)	1,90 (1,20 - 3,02)

DL, desequilíbrio de ligação de $r^2 \geq 0,5$ entre marcadores associados; qualquer um dos SNPs em DL podem explicar a associação observada com o vitiligo. FBAT, Teste Associação Baseado em Famílias.* *P*-valor, reportado o melhor modelo. OR, Taxa de Risco. CI, Intervalo de Confiança.

5.1.2. Análise Haplótipica dos Marcadores do Gene *BCHE*

Foi realizada análise haplótipica entre os alelos dos marcadores do gene *BCHE* que mostraram evidência de associação com vitiligo (tabela 5). O marcador rs2668209 não foi incluído nos haplótipos devido ao grau intermediário de DL desse marcador com os demais SNPs associados; o marcador rs4680607 foi excluído da análise por apresentar um desvio marginal ($P = 0,06$) do HWE.

Análise haplótipica envolvendo os SNPs rs1355538 e rs1803274 do gene *BCHE* com vitiligo revelou evidência de associação entre a doença e o haplótipo formado entre os alelos de risco “C” do rs1355538 e “G” do rs1803274 ($P = 0,005$), sendo este haplótipo supertransmitido em nossa população, conforme descrito na tabela 5. Vale notar que a análise foi realizada somente com os haplótipos cuja frequência do haplótipo foi $\geq 10\%$.

Tabela 5: Haplótipo entre os alelos dos marcadores do gene *BCHE* associados ao vitiligo

Haplótipo		Frequência Haplótipo	N° de Famílias Informativas	Z	FBAT (P-Valor)*
rs1355538	rs1803274				
C	G	0,46	82	2,75	0,005
T	G	0,33	101	0,26 (-)	0,79
T	A	0,19	81	1,14 (-)	0,25

FBAT, Teste de Associação Baseado em Famílias. Z, Teste Z (valores positivos indicam suscetibilidade e valores negativos indicam proteção). *Reportado o melhor modelo. Reportado haplótipos com frequência $\geq 10\%$

5.1.3. Influência das Variáveis Não-Genéticas Sobre a Associação entre Polimorfismos do Gene *BCHE* e Vitiligo

Para melhor entendimento da associação observada entre os polimorfismos rs1355538 e rs1803274 do gene *BCHE* e vitiligo, foi realizada uma análise estratificada da população de acordo com as covariáveis não-genéticas: idade de início da doença, presença de doenças autoimune epidemiologicamente associadas ao vitiligo e forma clínica. O sinal de associação para os dois marcadores associados concentrou-se nos subgrupos com a forma clínica do vitiligo do tipo não-segmentar e no subgrupo com a presença de doenças autoimune associadas.

Para verificar a influência da idade de início da doença sobre a associação observada para os marcadores do gene *BCHE*, a população foi estratificada utilizando-se como idade de corte 18 anos (média de idade de diagnóstico da doença em nossa população) e 25 anos (média de idade de diagnóstico reportada na literatura). Para o rs1355538, verificou-se uma concentração do sinal de associação nas sub-populações com idade de início do vitiligo superior a 18 e 25 anos, com um aumento da taxa de risco nesse grupo. Já para o rs1803274, o sinal de associação está enriquecido nas sub-populações com idade de início do vitiligo precoce, usando ambos os cortes de 18 e 25 anos (tabela 6).

Tabela 6: Influência de variáveis não-genéticas sobre a associação entre polimorfismos do gene *BCHE* e vitiligo

<i>BCHE</i>	Alelo Referência	Fenótipo	Nº Famílias	P-Valor*	OR (95% CI)	
rs1355538	C	Idade	≤ 18	119	NS	-
			> 18	93	0,01	2,35 (1,19 - 4,64)
			≤ 25	154	0,09	1,59 (0,92 - 2,74)
			> 25	58	0,02	3,53 (1,19 - 9,29)
		Doenças autoimune associadas	Sim	94	0,01	2,24 (1,16 - 4,31)
			Não	106	NS	-
		Forma Clínica	Segmentar	35	NS	-
			Não-Segmentar	166	0,009	1,98 (1,18 - 3,31)
rs1803274	A	Idade	≤ 18	119	0,04	0,57 (0,34 - 0,97)
			> 18	93	NS	-
			≤ 25	154	0,02	0,59 (0,37 - 0,94)
			> 25	58	NS	-
		Doenças autoimune associadas	Sim	94	0,02	0,54 (0,32 - 0,91)
			Não	106	NS	-
		Forma Clínica	Segmentar	35	NS	-
			Não-Segmentar	166	0,02	0,64 (0,43 - 0,95)

*P-valor, reportado o melhor modelo. OR, Taxa de Risco. CI, Intervalo de Confiança. NS, Não Significativo ($p > 0,05$)

Para Doenças autoimunes associadas, 12 famílias sem informação e para Forma clínica, 11 indivíduos sem informação.

5.1.4. Análise de Associação Caso-Controle do Gene *BCHE* com Vitiligo – Experimento de Replicação.

Análise de associação do tipo caso-controle foi conduzida com o intuito de replicar a evidência de associação para o rs1355538 e o rs1803274, previamente detectada na população de trios. Para esta análise, somente foram incluídos os casos de vitiligo com doença autoimune associada e forma clínica não-segmentar.

Conforme demonstrado na tabela 7, o marcador rs1355538 do gene *BCHE* não está associado ao vitiligo na população caso-controle. No entanto, evidência de associação entre o alelo “A” do marcador rs1803274 e vitiligo foi detectado, conferindo proteção na população independente do tipo caso-controle investigada.

Tabela 7: Análise de associação caso-controlre entre o gene *BCHE* e vitiligo

		Casos		Controles		χ^2	P-Valor*	OR (95% CI)
		N	(%)	N	(%)			
rs1803274	AA/AG	12	(19,4 %)	42	(35,3 %)	4,95	0,02	0,56 (0,32 - 0,97)
	GG	50	(80,6 %)	77	(64,7 %)			
rs1355538	CC/TC	46	(73 %)	81	(70,4 %)	0,13	0,71	1,09 (0,69 - 1,71)
	TT	17	(27 %)	34	(29,6 %)			

N, número de indivíduos. χ^2 , Qui-quadrado Pearson. P-valor, reportado modelo dominante. OR, Taxa de risco. CI, Intervalo de Confiança.

5.1.5. Análise Funcional de Correlação Genótipo-Fenótipo

Para avançar no entendimento do impacto da associação observada entre a variante rs1803274 do gene *BCHE* e vitiligo, foi investigada a correlação entre os genótipos do marcador rs1803274 e atividade plasmática da enzima BChE ([] U.l/ml). Níveis plasmáticos da BChE foram avaliados em 49 pacientes afetados com vitiligo (tabela 3) e uma variação estatisticamente significativa para a distribuição entre sexo ($P = 0,01$) foi observada. Redução estatisticamente significativa na atividade da enzima BChE foi detectada nos pacientes com vitiligo para o genótipo AA+AG do marcador rs1803274 quando comparados ao genótipo GG ($P = 0,01$), após correção para sexo, conforme demonstrado na figura 3.

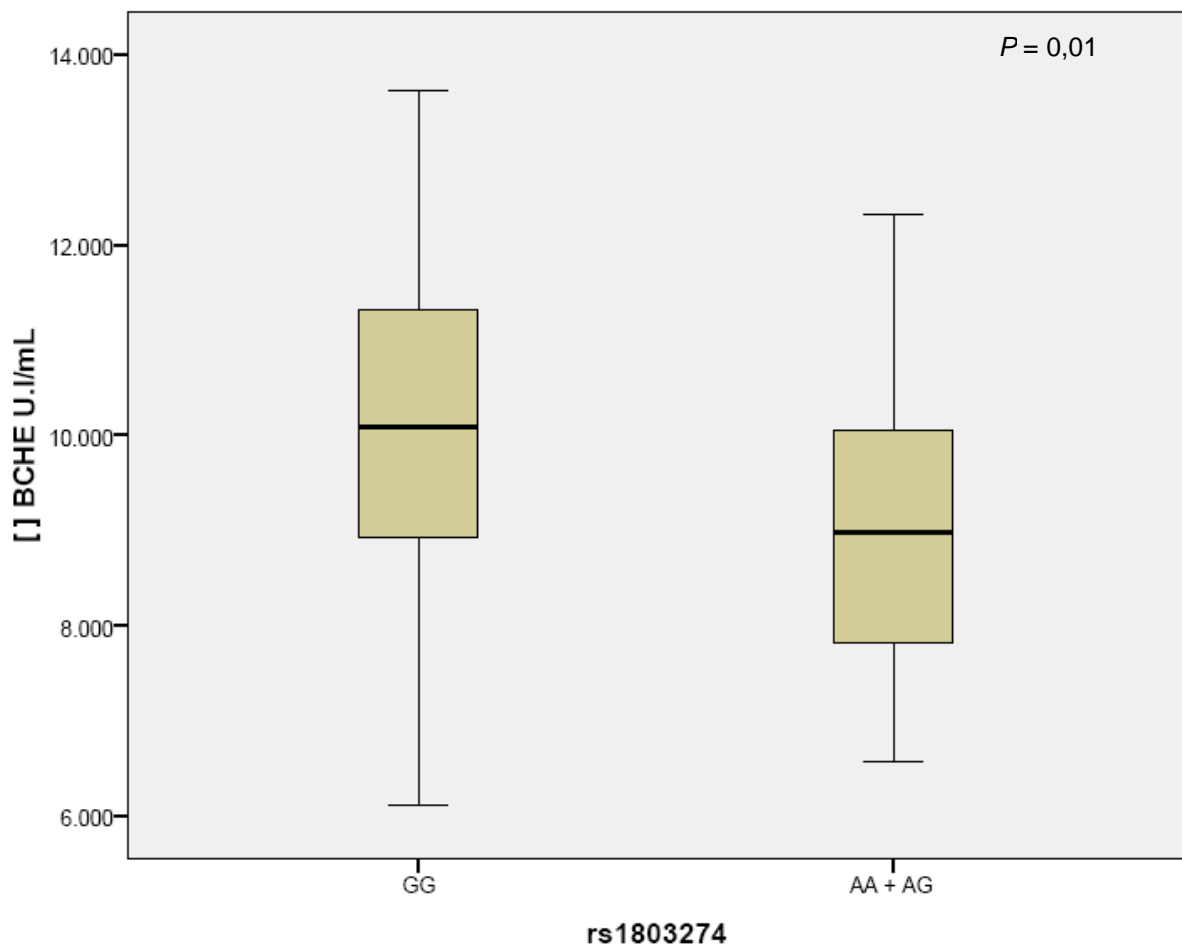


Figura 3: Atividade da enzima BChE de acordo com genótipos do rs1803274.

5.2. *TNF receptor superfamily, member 6 (FAS)*

5.2.1. Análise de Associação do Gene *FAS* com Vitiligo

Todas as frequências alélicas dos SNP testados estavam em HWE ($P > 0,05$). Análise de DL, usando o parâmetro r^2 , entre os marcadores rs2234767, rs4406738, rs2296603, rs7911226 e rs2234978 mostrou que eles são independentes (tag SNPs), considerando $r^2 = 0,80$. No entanto há algum grau não desprezível de DL entre os marcadores rs4406738 e rs2296603 ($r^2 = 0,58$), conforme demonstrado na figura 4.

Análise de associação univariada detectou evidência de associação entre vitiligo e o alelo “G” do polimorfismo rs2234978 ($P = 0,01$) e o alelo “A” do

polimorfismo rs4406738 ($P = 0,01$) do gene *FAS* nas famílias estudadas, com OR indicativo de suscetibilidade (tabela 8).

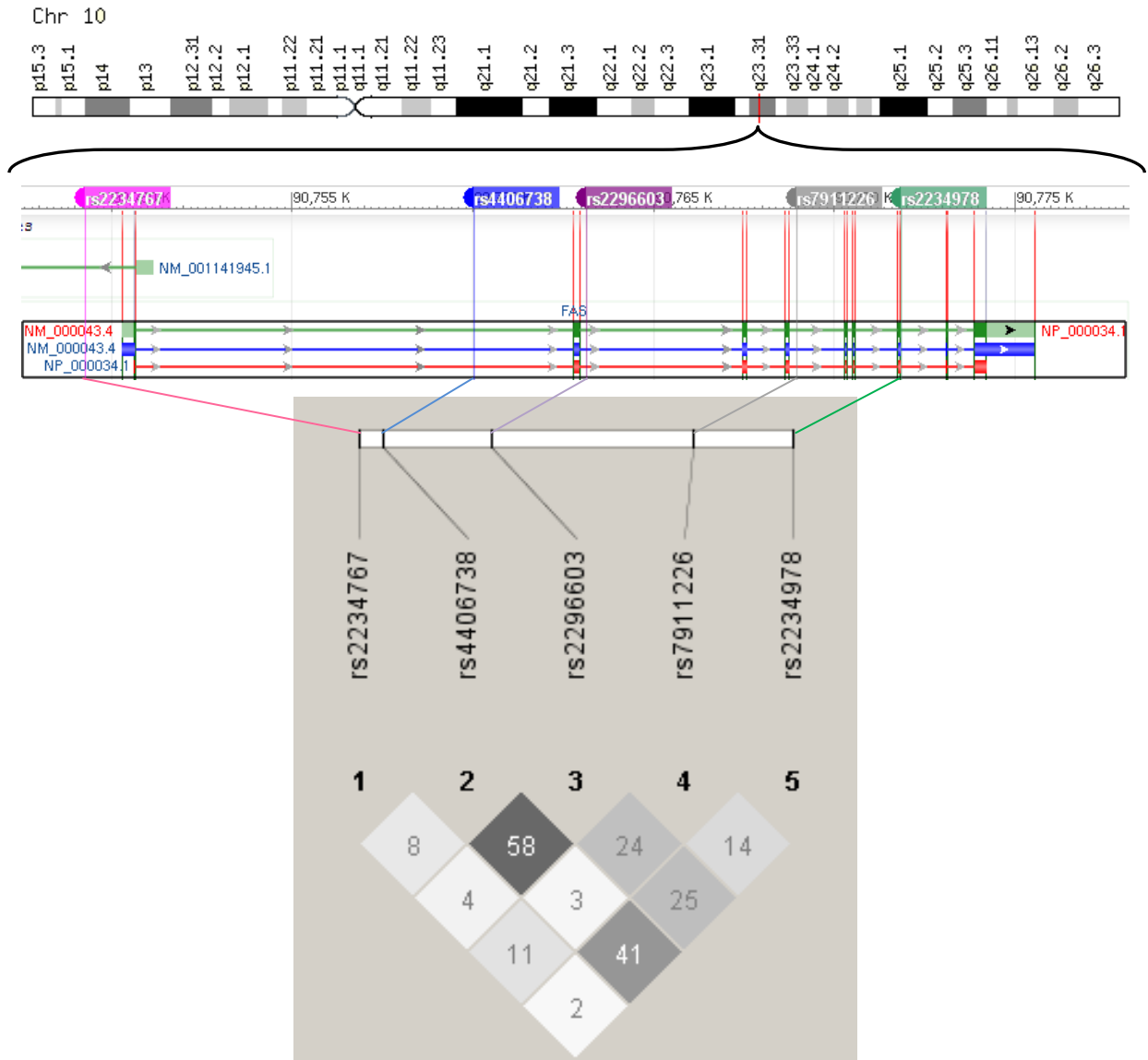


Figura 4: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *FAS*. Os números no interior dos quadrados indicam a proporção de DL, em %, calculado utilizando-se o parâmetro r^2 ; o código de cores reflete a intensidade de DL entre dois *loci*: quanto mais escuro o quadrado, maior o DL entre os SNPs.

Tabela 8: Análise de associação dos SNPs do gene *FAS* e vitiligo

<i>FAS</i>	rs2234767	rs4406738	rs2296603	rs7911226	rs2234978
Alelo Referência	A	A	A	C	G
Frequência Alélica	0,17	0,56	0,42	0,32	0,74
Nº Famílias Informativas	66	69	94	87	47
FBAT (<i>P</i> - valor)*	NS	0,01	NS	NS	0,01
Univariada OR (95% CI)	-	1,91 (1,11 - 3,30)	-	-	2,17 (1,12 - 4,20)

FBAT, Teste Associação Baseado em Famílias. * *P*-valor, reportado o melhor modelo. NS, Não Significativo ($P > 0,05$). OR, Taxa de Risco. CI, Intervalo de Confiança.

5.2.2. Análise Haplótipica entre os Marcadores do Gene *FAS*

Análise haplotípica entre os alelos dos marcadores rs2234978 e rs4406738 do gene *FAS* mostrou que o haplótipo formado com o alelo “A” do marcador rs2234978 e o alelo “T” do rs4406738 está sub-transmitido em nossa população, com uma evidência significativa de associação ($P = 0,009$), conforme descrito na tabela 9. Vale notar que a análise foi realizada somente com os haplótipos cuja frequência do haplótipo foi $\geq 10\%$.

Tabela 9: Haplótipos entre os alelos dos marcadores associados do gene *FAS*

Haplótipo		Frequência Haplótipo	Nº Famílias	Z	FBAT (<i>P</i> -Valor)*
rs2234978	rs4406738				
G	A	0,55	56	2,12	0,03
A	T	0,25	82,9	2,60 (-)	0,009
G	T	0,18	65	0,68	0,49

FBAT, Teste de Associação Baseado em Famílias. Z, Teste Z (valores positivos indicam suscetibilidade e valores negativos indicam proteção). *Reportado o melhor modelo. Reportado haplótipos com frequência $\geq 10\%$.

5.2.3. Influência das Variáveis Não-Genéticas sobre a Associação entre Polimorfismos do Gene *FAS* e Vitiligo

Ao estratificar a população de acordo com as covariáveis não-genéticas já descritas a fim de verificar a influência dessas covariáveis sobre a associação observada entre os polimorfismos rs2234978, rs4406738 e vitiligo, observamos que o sinal de associação para esses marcadores concentra-se nos trios que apresentam vitiligo na forma clínica não-segmentar. Para idade de início da doença, não observamos um padrão claro de associação para o gene *FAS*; o alelo “A” do marcador rs4406738 está associado com suscetibilidade nos indivíduos com vitiligo de início precoce, usando um corte de 25 anos, enquanto que o alelo “G” do marcador rs2234978, ndivíduos com vitiligo entre > 18 e ≤ 25 (tabela 10).

Tabela 10: Influência de variáveis não-genéticas sobre a associação entre polimorfismos do gene *FAS* e vitiligo

<i>FAS</i>	Alelo Referência	Fenótipo	N° Famílias	<i>P</i> -Valor*	OR (95% CI)	
rs4406738	A	Idade	≤ 18	119	0,07	1,98 (0,93 - 4,25)
			> 18	93	0,09	2,16 (0,88 - 5,32)
			≤ 25	154	0,02	2,11 (1,11 - 4,02)
			> 25	58	NS	-
		Doenças autoimune associadas	Sim	94	NS	-
			Não	106	0,009	3,25 (1,34 - 7,87)
		Forma Clínica	Segmentar	35	NS	-
			Não-Segmentar	166	0,007	2,30 (1,26 - 4,22)
rs2234978	G	Idade	≤ 18	119	NS	-
			> 18	93	0,03	3,67 (1,08 - 12,49)
			≤ 25	154	0,06	1,99 (0,96 - 4,14)
			> 25	58	NS	-
		Doenças autoimune associadas	Sim	94	0,07	2,37 (0,92 - 6,09)
			Não	106	NS	-
		Forma Clínica	Segmentar	35	NS	-
			Não-Segmentar	166	0,005	3,07 (1,39 - 6,79)

**P*-valor, reportado o melhor modelo. OR, Taxa de Risco. CI, Intervalo de Confiança. NS, Não Significativo (*P* > 0,05)
Para Doenças autoimunes associadas, 12 famílias sem informação e para Forma clínica, 11 indivíduos sem informação.

5.3. Catecol-O-Metiltransferase (*COMT*)

5.3.1. Análise de Associação do Gene *COMT* com Vitiligo

Foram testados dois SNPs intragênicos no gene *COMT* para associação com vitiligo. As frequências alélicas dos marcadores testados para o gene *COMT* estavam em HWE ($P > 0,05$). Análise de DL, usando o parâmetro r^2 , entre os marcadores rs4680 e rs933271 mostrou que eles são independentes (tag SNPs, $r^2 = 1$), conforme demonstrado na figura 5.

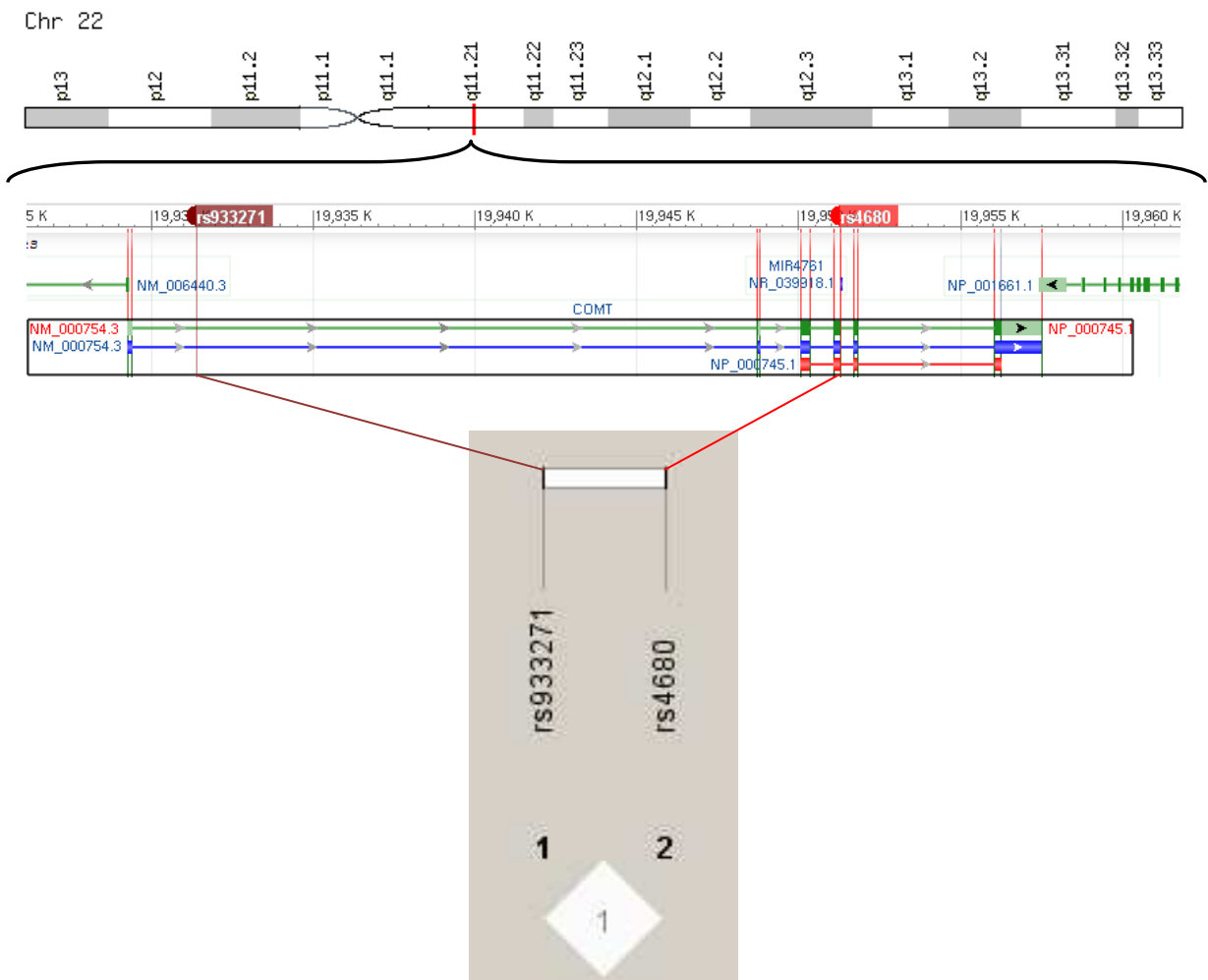


Figura 5: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *COMT*. O número no interior do quadrado indica a proporção de DL, em %, calculado utilizando o parâmetro r^2 ; o código de cores reflete a intensidade de DL entre dois *loci*: quanto mais escuro o quadrado, maior o DL entre os SNPs.

Análise de associação baseada em família revelou evidência de associação entre vitiligo e o alelo “C” do polimorfismo rs933271 do gene *COMT* na população estudada ($P = 0,01$), com valor de OR indicativo de proteção (tabela 11).

Tabela 11: Análise de associação dos SNPs do gene *COMT* e vitiligo

COMT	rs4680	rs933271
Alelo Referência	T	C
Frequência Alélica	0,42	0,37
Nº Famílias Informativas	96	89
FBAT (P - valor)*	NS	0,01
Univariada OR (95% CI)	-	0,58 (0,38 - 0,88)

FBAT, Teste Associação Baseado em Famílias.* P -valor, reportado o melhor modelo. NS, Não Significativo ($P > 0,05$). OR, Taxa de Risco. CI, Intervalo de Confiança.

5.3.2. Influência de Variáveis Não-Genéticas sobre a Associação entre Polimorfismos do Gene *COMT* e Vitiligo

Para verificar a influência das covariáveis não-genéticas já descritas e a associação observada entre o polimorfismo rs933271 do gene *COMT* e vitiligo, foi realizada uma análise estratificada da população. Ao estratificar a população por presença/ausência de doenças autoimunes associadas e forma clínica, observou-se que o sinal de associação para o marcador rs933271 estava concentrado entre as famílias sem doenças autoimune associada [$P = 0,02$; OR (95% CI) 0,60 (0,39 – 0,92)], já a forma clínica do vitiligo não está influenciando na associação encontrada.

Ao estratificar a população por idade de início da doença, usando corte de 18 e 25 anos, obteve-se como resultado uma associação idade-dependente, ou seja: a associação encontrada concentra-se nos indivíduos cuja doença manifestou-se precocemente (idade ≤ 18 anos e ≤ 25 anos), conforme demonstrado na tabela 12.

Tabela 12: Influência de variáveis não-genéticas sobre a associação entre polimorfismos do gene *COMT* e vitiligo

<i>COMT</i>	Alelo Referência	Fenótipo	Nº Famílias	P-Valor*	OR (95% CI)	
rs933271	C	Idade	≤ 18	119	0,01	0,51 (0,30 - 0,88)
			> 18	93	NS	-
			≤ 25	154	0,007	0,51 (0,31 - 0,83)
			> 25	58	NS	-
		Doenças autoimune associadas	Sim	94	NS	-
			Não	106	0,02	0,60 (0,39 - 0,92)
		Forma Clínica	Segmentar	35	NS	-
			Não-Segmentar	166	NS	-

*P-valor, reportado o melhor modelo. OR, Taxa de Risco. CI, Intervalo de Confiança. NS, Não Significativo ($p > 0,05$)
 Para Doenças autoimunes associadas, 12 famílias sem informação e para Forma clínica, 11 indivíduos sem informação.

5.4. Endotelina -1 (*EDN1*)

Foram testados três SNPs intragênicos ao gene *EDN1* (rs2070699, rs2071942 e rs5370) para associação com vitiligo. As frequências alélicas dos polimorfismos testados para o gene *EDN1* estavam em HWE ($P > 0,05$). Análise de DL entre os três marcadores mostrou o rs2070699 como um tag SNP *singleton*, enquanto que os SNPs rs2071942 e rs5370 estavam em DL ($r^2 = 0,85$) (figura 6).

Na amostra populacional estudada os polimorfismos (rs2070699, rs2071942 e rs5370) do gene *EDN1* não estão associados à suscetibilidade ao vitiligo ou suas manifestações clínicas (tabela 13).

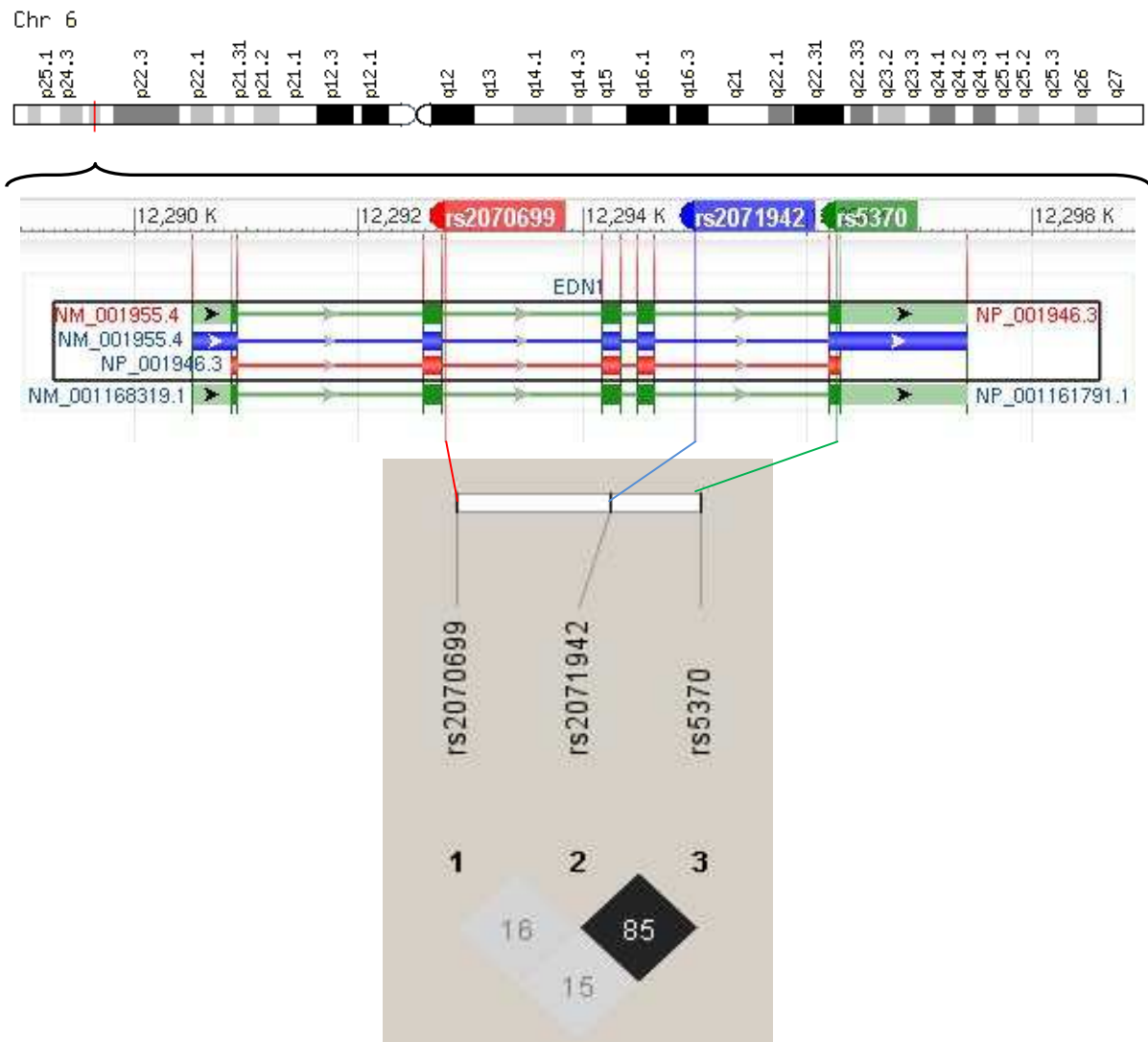


Figura 6: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *EDN1*. O número no interior do quadrado indica a proporção de DL, em %, calculado utilizando o parâmetro r^2 ; o código de cores reflete a intensidade de DL entre dois *loci*: quanto mais escuro o quadrado, maior o DL entre os SNPs.

Tabela 13: Análise de Associação dos SNPs do gene *EDN1* com vitiligo

EDN1	rs2070699	rs2071942	rs5370
Alelo Referência	G	G	G
Frequência Alélica	0,57	0,79	0,8
Nº Famílias Informativas	40	26	22
FBAT (<i>P</i> - valor)*	NS	NS	NS
Univariada OR (95% CI)	-	-	-

FBAT, Teste Associação Baseado em Famílias.* *P*-valor, reportado o melhor modelo.
NS, Não Significativo ($P > 0,05$). OR, Taxa de Risco. CI, Intervalo de Confiança.

6. DISCUSSÃO

6.1. ESTUDOS GENÉTICOS – PODER E LIMITAÇÕES

Como em todos os desenhos experimentais, os estudos genéticos, sejam de ligação ou de associação (incluindo os GWAS), apresentam seus poderes e limitações. Estudos de ligação tiveram sucessos notáveis na identificação das bases moleculares de doenças monogênicas, mas pouco sucesso com doenças de fenótipos complexos, como por exemplo, o vitiligo, entre outras. Isso ocorre devido à natureza dos estudos de ligação, que tem baixo poder para detectar *loci* que abrigam genes com efeito moderado a fraco no controle da suscetibilidade à doença (83).

A identificação de variantes de relevância biológica causal na doença, levando em consideração a grande variabilidade do genoma humano, é o principal desafio para os estudos de associação. Associação entre polimorfismo genético e uma característica pode acontecer devido a várias razões, o que torna difícil o entendimento do real significado do sinal de associação. Dentre esses motivos, está a associação espúria, por exemplo, por estratificação da população em subgrupos distintos geneticamente (86). Outras situações que limitam os resultados dos estudos de associação são a ausência de uma clara definição do fenótipo e a correta seleção dos controles em um desenho de estudo do tipo caso-controle. Como pode ser observado na tabela 2, não existe uma concordância nos fenótipos analisados nos estudos de gene candidatos para o vitiligo: alguns estudos somente consideraram vitiligo *per se*, ou seja, não levaram em consideração a forma clínica da doença na definição do fenótipo. Já outros estudos analisaram vitiligo generalizado associado com doenças autoimune, um fenótipo mais bem definido, mas claramente distinto do vitiligo *per se*. Além disso, não existe um consenso nem mesmo na definição de vitiligo generalizado pelos próprios pesquisadores da área, o que dificulta a interpretação nas análises. Diferentes fenótipos clínicos podem ainda ser devido à heterogeneidade genética na patogênese da doença, que pode levar à falta de replicação nos estudos de associação. Uma análise dos subgrupos de casos

definidos, por exemplo, por histopatologia, ajudaria a enfrentar a complexidade da doença. Outra estratégia que minimiza os problemas mencionados acima são os estudos de associação baseados em famílias, cujo desenho controla, intrinsecamente, para uma possível estratificação da amostra populacional, além de contornar a complexa definição do indivíduo controle. No entanto, limitações para esse desenho de estudo também existem, como: dificuldades no recrutamento dos membros da família (pais, irmãos, avós), custo, dificuldade de aplicação em doenças de início tardio e em doenças que apresentam baixa prevalência na população, e a inclusão, na análise, apenas dos trios nos quais os pais eram heterozigotos para o marcador em análise.

Ainda no contexto de estudos de associação, a abordagem de gene candidato tem a vantagem de maximizar inferências sobre plausibilidade biológica e causalidade da doença; no entanto, essa abordagem é limitada pela quantidade de informação disponível sobre a função do gene no contexto da doença em questão. É possível dizer que o maior desafio em um estudo de gene candidato é escolher o gene alvo, pois existem em torno de 30.000 genes no genoma humano e mais de 10 milhões de SNPs reportados em banco de dados públicos, e é possível especular que qualquer um desses 30.000 genes seja um potencial gene candidato (225). Alternativamente, GWAS têm a vantagem de rastrear o genoma inteiro para associação, sem depender da escolha um gene candidato *a priori*; porém os GWAS também apresentam suas limitações. Uma complicação do GWAS consiste no número excessivo de testes necessários devido à densidade de SNP que são mapeados, fazendo com que níveis rigorosos de significância estatística precisem ser atingidos (5×10^{-8}) para consolidar a associação. Assim, nesse tipo de estudo, grande tamanho amostral é necessário, e a chance de erro tipo I (falso positivo) é potencialmente inflacionada. De uma maneira geral, as variantes genéticas identificadas a partir dos GWAS conferem baixo risco para a suscetibilidade a doença (OR 1.3 - 2.0), o que limita a interpretação da contribuição genética dessas variantes na patogênese da doença. Outra limitação dos GWAS consiste em avaliar apenas variantes genéticas comuns (FAM \geq 5%) e não capturar variantes raras (FAM \leq 1%) ou estruturais (inserção, deleção, duplicação) (226). Esta última limitação é devido, em parte, pela capacidade dos microarranjos disponíveis no

momento, de comportarem uma densidade de até 1 milhão de SNPs, pelo custo elevado de se analisar variantes comuns e raras, e pelas informações disponíveis nos bancos de dados públicos geradas a partir do sequenciamento em baixa escala, dificultando a detecção de variações genéticas com baixa frequência.

Ao contrário do que se esperava, para características complexas, os GWAS têm confirmado associação com poucos genes e regiões cromossômicas previamente identificadas em estudos de associação de genes candidatos e estudos genéticos de ligação – a razão para este achado inesperado é objeto de intenso debate. No entanto, para muitos pesquisadores, o GWAS tem sido considerado uma ferramenta geradora de hipótese, pelo fato de detectar genes nunca antes descobertos por estudos de associação de gene candidato.

6.2. ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO COM GENE CANDIDATO INÉDITO

Selecionar um gene candidato é uma ciência notoriamente imprecisa, no entanto, representa uma ferramenta importante para novas descobertas. Geralmente estudos de associação de gene candidato partem de hipóteses geradas a partir de informações prévias sobre o envolvimento deste em alguma via biológica importante, bem como a partir de informações posicionais geradas pelos estudos genéticos de ligação. Outras abordagens para seleção de genes candidatos podem ser usadas, como a farmacogenética/farmacogenômica, cujo objetivo é selecionar genes que codificam proteínas envolvidas no mecanismo de ação de algum medicamento, ou ainda, modelos animais, cujo interesse é de investigar genes que influenciam certo fenótipo em modelos animais (227).

No caso das doenças complexas, qualquer uma das estratégias citadas acima, usadas de forma isolada, não é ideal para detectar o gene de suscetibilidade a doença. Seleção de genes candidatos a partir da biologia da doença pode não ser uma boa estratégia nos casos de doenças complexas, em que os mecanismos moleculares da doença são pouco compreendidos, como no caso do vitiligo. Da mesma maneira, a escolha baseada somente levando em consideração a posição cromossomal previamente identificada por ligação pode não ser eficiente, pois,

geralmente regiões cromossômicas identificadas por ligação são grandes e podem conter de dezenas a centenas de genes.

6.2.1. *BCHE*

Até o momento, este é o primeiro estudo a investigar associação entre polimorfismos no gene *BCHE* e vitiligo. Além disso, não existem dados na literatura descrevendo estudos de associação realizados entre polimorfismos no gene *BCHE* e doenças autoimune epidemiologicamente associadas ao vitiligo. A variante K do gene *BCHE* já foi descrita como um fator predisponente para manifestação precoce de Diabetes Tipo 1 (228); no entanto, essa doença não está epidemiologicamente associada ao vitiligo.

O interesse em estudar o gene *BCHE* desvia da idéia de selecionar genes candidatos posicionais e funcionais; pelo contrário, esse gene não está localizado em nenhuma região cromossômica previamente identificada em ligação com o vitiligo, e ainda, sua função fisiológica não está bem compreendida. No entanto, na década passada, surgiram os primeiros indícios possivelmente relacionando BChE e vitiligo: (i) a detecção da atividade da enzima BChE na epiderme humana; e (ii) a expressão da proteína e atividade da enzima BChE está diminuída em pacientes com vitiligo (58). Relação entre atividade da enzima BChE e vitiligo já foi previamente demonstrada, no entanto, nosso grupo foi o primeiro a evidenciar a relação entre genótipos do gene *BCHE* tanto com vitiligo, quanto com atividade da enzima, na mesma população.

Nossa análise de associação baseada em família realizada entre polimorfismos do gene *BCHE* e vitiligo mostrou associação estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) para os SNPs rs2668209, rs4680607, rs1803274, rs1355538. Pelo fato das distribuições de frequências alélicas do marcador rs4680607 desviarem marginalmente do HWE ($P = 0,06$), este foi excluído das análises, por limitar a interpretação do sinal de associação observado. O SNP rs2668209 apresenta certo grau de DL com o rs1803274 ($r^2 = 0,5$), um marcador previamente relacionado com alteração funcional na atividade da enzima BChE (189). Assim, apenas o SNP rs1803274 foi considerado, como representante deste *bin*, para fins

de análises que necessitam da estratificação da população, reduzindo-se desta forma a chance de erro do tipo I (falso positivo) por inflação do número de testes. Por fim, o rs1355538 é um *singleton*. Sendo assim, nosso estudo detectou dois sinais independentes de associação entre o gene *BCHE* e vitiligo, sendo eles representados pelos SNPs rs1803274 e rs1355538.

Análise estratificada da população por forma clínica, idade de início da doença e presença de doenças autoimune epidemiologicamente associadas ao vitiligo foi realizada em seguida, com o intuito de refinar o resultado obtido. Para ambos os marcadores, observa-se que a associação se concentra no grupo com presença de doenças autoimune epidemiologicamente associadas ao vitiligo e para a forma clínica não-segmentar. Vale ressaltar que o alelo “C” do rs1355538 está associado com suscetibilidade, e o alelo “A” do rs1803274 está associado com proteção ao vitiligo; nesse cenário, uma análise investigando mais profundamente a natureza das doenças autoimune associadas para cada marcador seria interessante. Já a ausência de associação para a forma clínica segmentar pode ser devido ao número pequeno de famílias (somente 35 famílias) com esse tipo da doença.

Ao estratificar a população por idade de início da doença, foi possível observar que o alelo “C” do rs1355538 está associado com suscetibilidade nos indivíduos > 18 e > 25 anos e o alelo “A” do rs1803274 está associado com proteção ao vitiligo nos indivíduos com ≤ 18 e ≤ 25 anos, o que sugere que o efeito deste gene seja mais relevante apenas em casos de início tardio da doença. Interessantemente, a variante rs1803274 foi associada com idade de início tardio e lenta progressão da doença de Alzheimer (229).

Devido ao fato da associação detectada para o gene *BCHE* ser inédita, replicação dos resultados do estudo original é crucial para a credibilidade da associação encontrada. Além disso, concordância entre os fenótipos analisados é uma das premissas para os estudos de replicação. Sendo assim, os polimorfismos rs1803274 e rs1355538 foram testados para replicação em uma população independente, do tipo caso-controle, nos casos afetados com vitiligo não-segmentar e doença autoimune epidemiologicamente associada ao vitiligo. Evidência significativa de associação foi detectada para o alelo de proteção “A” do rs1803274, reforçando a associação previamente identificada na população de famílias. É

importante mencionar que a associação com o marcador rs1803274 foi replicada para o mesmo alelo e no mesmo sentido da associação original. É possível especular que a associação encontrada para o rs1803274 no estudo de replicação ao estratificar a amostra populacional por presença de doença autoimune e forma clínica seja pelo fato do componente genético está enriquecido nesse subgrupo da população, refletindo o verdadeiro grupo de suscetibilidade para esse polimorfismo. Ao contrário do que se esperava, a associação para o SNP rs1355538 não foi estatisticamente significativa na população caso-controle de replicação, no entanto, essa situação pode ser explicada pelo tamanho amostral da população caso-controle, o que limita a interpretação do achado. Outra observação digna de nota é que o polimorfismo rs1355538 é intrônico, portanto, o impacto funcional desta variante é desconhecido. Estudos genéticos de associação não permitem inferências sobre a base biológica do efeito estatístico observado. Uma das mais excitantes e recentes descobertas da genética é a de que muito do DNA genômico que se considerava “silencioso” é na verdade transcrito em pequenas moléculas biologicamente ativas de RNA (230, 231). Pode-se assim, especular sobre um possível impacto das variações intrônicas como o rs1355538 sobre a atividade regulatória destas moléculas de RNA. É possível que esta variação esteja em DL com a variação causal, ainda desconhecida, na nossa população; vale notar que esta variação não está em desequilíbrio de ligação com nenhum SNP funcional previamente descrito nos bancos de dados públicos. Finalmente, dada a falha na replicação do achado de associação para este marcador, é possível que o sinal original de associação seja espúrio. Neste sentido, uma alternativa seria aumentar a população caso-controle utilizada para replicação.

Já o SNP rs1803274, também conhecido como “mutação K” (termo consagrado pelo uso, embora, pelo critério de FAM, a variante é um polimorfismo), é uma variação de ponto na posição do nucleotídeo 1615 (GCA → ACA) do exon 4 do gene *BCHE*, que leva a mudança do aminoácido alanina (Ala) 539 para treonina (Thr) (232). Essa variação foi previamente associada com uma redução de aproximadamente 33% da atividade da enzima BChE quando comparada com a enzima usual, seja por retardar a síntese ou acelerar a degradação da enzima (189).

A fim de avançarmos no entendimento do impacto da variante rs1803274 sobre a fisiopatogênese do vitiligo, buscamos estabelecer uma correlação entre os genótipos AA+AG *versus* GG e atividade plasmática da enzima BChE no plasma de pacientes com vitiligo. Como resultado, observamos que a atividade da enzima BChE no grupo com o genótipo GG difere estatisticamente do grupo com o genótipo AA+AG ($P = 0,01$). Redução na atividade da enzima relacionada ao genótipo AA+AG já era esperada (189). Interessantemente, a redução da atividade da enzima está relacionada com proteção ao vitiligo nos pacientes estudados. Apesar de não ter sido realizada análise correlacionando idade de início do vitiligo e atividade da enzima BChE, devido ao tamanho amostral do estudo funcional, uma análise conjunta dos dados genéticos e bioquímicos sugere que a redução da atividade da enzima BChE nos indivíduos com vitiligo, que carregam a variante genética *BCHE* K, exerce algum mecanismo de proteção nesses indivíduos levando a um início tardio da doença.

Furtado-Alle e cols. sugerem que a baixa atividade da enzima BChE, previamente relacionada com a “mutação K”, seria devido uma associação do alelo “A” da variante K com o alelo “A” da variante rs1126680 (-116, exon 1) ($D' = 92\%$) (233). No entanto, em nossa população, tanto a análise de associação envolvendo o marcador rs1126680 isolado quanto uma análise haplotípica envolvendo alelos dos SNPs rs1126680 e rs1803274 (dados não publicados) falharam em revelar um sinal estatisticamente significativo de associação com vitiligo. Além disso, os marcadores rs1126680 e rs1803274 não estão em DL em nossa população, quando estimada usando o parâmetro r^2 ($r^2=0,28$). No entanto, vale notar que diferentes métodos de avaliar o DL foram utilizados entre os estudos, sendo que, o estudo de Furtado-Alle e cols. utilizaram um parâmetro menos conservador (D') para avaliar DL entre os polimorfismos. No presente estudo, não realizamos análise avaliando a atividade da enzima BChE frente os haplótipos formados com os marcadores rs1126680 x rs1802374, devido ao número reduzido de indivíduos em cada haplótipo.

Já está estabelecido que alguns fatores e patologias causam uma redução na atividade da enzima BChE, entre eles, contato com compostos organofosforados e gestação (234). Recentemente, foi realizado um GWAS com o objetivo de detectar variantes genéticas que afetavam a atividade da enzima BChE. Aproximadamente

2.4 milhões de SNPs foram genotipados em 8791 indivíduos com dosagem da enzima BChE. Como resultados, os autores detectaram associação estatisticamente significativa com três SNPs do gene *BCHE* (rs1803274 $P=5,8 \times 10^{-262}$, rs2668196 $P=7,8 \times 10^{-47}$ e rs2034445 $P=2,9 \times 10^{-12}$), e outros quatro loci: *RNPEP* (rs4950806 $P=9,4 \times 10^{-16}$), *RAPH1-ABI2* (rs11675251 $P=4,1 \times 10^{-18}$), *UGT1A1* (rs7592624 $P=4,0 \times 10^{-8}$) e uma variante genética na região intergênica no cromossomo 8 (rs6601299 $P=1,4 \times 10^{-8}$) (235). Dentre os polimorfismos genéticos descritos associados com alteração na atividade da enzima BChE, somente o rs1803274 foi avaliado no presente estudo e uma concordância entre os resultados foi obtida.

Acredita-se que o vitiligo, bem como outras doenças complexas, seja causado pela interação entre variantes genéticas e fatores ambientais. Nosso grupo já identificou polimorfismos genéticos no gene *DDR1* associado com um aumento do risco ao vitiligo (OR = 5.27) na mesma população estudada para o presente estudo (73). Agora, embora o desenho do nosso estudo não nos permite definir se a redução da atividade da enzima BChE encontrada nos pacientes com vitiligo é a causa ou efeito da doença, os resultados do presente estudo implicam o gene *BCHE*, em especial, a variante genética *BCHE* K desempenhando um papel na patogênese do vitiligo.

6.3. GENES DE INTERESSE PARA REPLICAÇÃO

Estudos de replicação têm por objetivo buscar a confirmação dos sinais positivos de associação entre marcadores genéticos e fenótipos complexos, de forma independente do estudo original, utilizando-se amostras populacionais distintas, de preferência com diferente *background* genético.

Já está bem consolidado o conceito de que achados originais de associação precisam ser validados por replicação, pois nem sempre um sinal estatisticamente significativo de associação significa o achado de uma variante genética causal. Assim, a abordagem de replicação é importante para se evitar resultados falsos positivos, visto que ferramentas estatísticas têm poder limitado de discriminar verdadeira associação de sinais espúrios. Estudos de replicação também são essenciais para garantir que o resultado original está isento de erros e distorções

que podem, inevitavelmente, afetar o resultado de qualquer estudo, como por exemplo, grupos controle inadequados, erros de genotipagem, viés no desenho do estudo, entre outros.

Resultados positivos de replicação indicam forte evidência acumulativa em favor de uma participação real de variantes do gene em estudo sobre o controle do fenótipo. Existem, pelo menos, duas possibilidades de resultados positivos de replicação: (i) a replicação alélica, quando o mesmo polimorfismo e alelo para um dado gene do estudo original são novamente encontrados em associação. Podemos chamar esta situação de “replicação perfeita”, que sugere que a variante genética replicada seja ou esteja muito próxima da variante genética causal; conseqüentemente, se está perto de se desvendar pelo menos um dos genes envolvidos na patogênese da doença; (ii) a replicação do gene, quando associação com marcadores do gene candidato é replicada, porém as variantes genéticas detectadas em associação são diferentes das do estudo original. Esse último cenário não permite se descartar um importante envolvimento do gene estudado na patogênese da doença, mas sim, significa que a variante genética causal está distante de ser desvendada e esforços adicionais serão necessários.

Ausência de replicação indica, possivelmente, que o sinal de associação do estudo original foi espúrio. Entre outras razões de falta de replicação nos estudos de associação, podemos mencionar um tamanho amostral pequeno gerando poder estatístico inadequado, padrões de DL específicos para uma população, estratificação da população, inconsistência na definição do fenótipo entre os estudos e divergência entre os marcadores genotipados. Uma forma de enfrentar os problemas de replicação em doenças complexas é a meta-análise dos resultados dos estudos. No entanto, o resultado de uma meta-análise é melhor quando os estudos foram realizados sob condições homogêneas, fenótipos definidos sob os mesmos critérios e análises estatísticas similares (83).

O presente estudo testou, para replicação, polimorfismos dos genes candidatos *FAS*, *COMT* e *EDN1*. Na época do desenho do nosso estudo, não havia nenhuma publicação de replicação da associação encontrada para esses genes, no entanto, atualmente, devido a existência de resultados contraditórios para esses genes, o presente estudo é uma “contra-prova” sobre um possível envolvimento dos

genes *FAS*, *COMT* e *EDN1* na patogênese do vitiligo. Outra razão que nos motivou a seleção dos genes *COMT* e *EDN1* foi devido às suas localizações cromossômicas: ambos os genes estão localizados em região previamente identificada por estudo genético de ligação, nos *loci* 22q11 e 6p21, respectivamente (103). Diferentemente dos genes mencionados acima, o gene *FAS* não está localizado em região cromossômica previamente identificada em estudo de ligação, no entanto, a qualidade do estudo original (141), que gerou um resultado bastante consistente, foi decisiva.

A fim de se aumentar o poder de interpretação, o desenho do presente estudo visou combinar o teste para replicação do mesmo SNP associado no estudo original com uma cobertura física completa para os genes selecionados, usando-se tag SNPs escolhidos a partir dos parâmetros de $FAM = 0,2$ e $r^2 = 0,8$, a procura de variantes adicionais associadas com a doença ou variantes que estejam em forte desequilíbrio de ligação com a variante causal. Nesse contexto, essa abordagem é essencial, pois falha na cobertura física completa dos genes pode dificultar o entendimento do sinal observado.

6.3.1. *FAS* e *COMT*

Nosso estudo replicou a associação previamente descrita entre vitiligo e os genes *FAS* e *COMT*.

Análise de associação baseada em família realizada entre vitiligo e polimorfismos do gene *FAS* mostrou associação estatisticamente significativa ($P = 0,01$) para os alelos “G” do rs2234978 e “A” do rs4406738, ambos com OR indicativo de suscetibilidade. Levando em consideração a estrutura de DL, em nossa população, entre os SNPs rs2234978 e rs4406738 ($r^2 = 0,41$), é possível sugerir que nosso estudo detectou dois sinais independentes de associação entre o gene *FAS* e vitiligo, representados pelos SNPs mencionados acima. Vale notar que um $r^2 = 0,41$ gera um debate do quanto isso significaria DL ou não, já que não existem limites bem definidos de qual valor de r^2 não deve mais ser considerado DL.

Ao explorar um possível efeito de variáveis não genéticas sobre a associação observada para os polimorfismos do gene *FAS*, observamos um aumento na taxa de

risco entre o subgrupo com vitiligo do tipo não-segmentar, para ambos os marcadores, e para o subgrupo com ausência de comorbidades autoimune, para o marcador rs4406738. Quando se analisa idade de início da doença, observa-se uma tendência de o sinal de associação concentrar-se no subgrupo com vitiligo de início precoce (≤ 25 anos), sendo este resultado muito semelhante ao observado para a população chinesa, porém para a variante *FAS*-1377 (141). Para vitiligo, idade de início precoce tem sido associada à ocorrência familiar de vitiligo generalizado (12). Essa observação está de acordo com a noção amplamente aceita de que doenças complexas, tais como infecção, diabetes *mellitus* e câncer, quando se manifestam precocemente, possuem um determinante genético mais acentuado. Vitiligo de início precoce, sem tratamento, está associado com uma maior gravidade da doença, tendendo a ser maior a extensão da área acometida. Além disso, probandos com início precoce da doença tendem a ter uma maior proporção de seus familiares afetados com vitiligo do que probandos com idade de início do vitiligo tardio (10).

O SNP rs2234978, gene *FAS*, está localizado no exon 6, e é uma variante sinônima C/T que resulta em um novo códon que codifica o mesmo aminoácido, treonina (Thr). Mecanismos pelos quais SNPs sinônimos podem afetar a função da proteína incluem, por exemplo, um impacto sobre a estrutura secundária do RNAm, com consequências sobre o nível de expressão da proteína (236). Já o SNP rs4406738 é intrônico e não está em desequilíbrio de ligação com nenhum SNP funcional previamente descrito nos bancos de dados públicos. Assim, o impacto funcional desta variante é desconhecido. Um possível papel para as variantes intrônicas foi discutido no item 6.2.1.

O primeiro estudo a investigar associação entre o gene *FAS* e vitiligo, identificou o rs2234767 (*FAS* -1377 G>A) associado ao aumento de risco do vitiligo em chineses da etnia Han ($P = 0,006$) (141). Nosso estudo não detectou o polimorfismo rs2234767 associado com suscetibilidade ao vitiligo, e ainda, esse polimorfismo não está em DL com os SNPs do gene *FAS* descritos em associação em nossa população (DL entre rs2234767 e rs4406738: $r^2 = 0,08$; DL entre rs2234767 e rs2234978: $r^2 = 0,02$). Birlea e cols. também investigaram, em caucasianos, polimorfismos do gene *FAS*, bem como de outros genes previamente associados com vitiligo, e não detectaram evidência de associação entre o

rs2234767 ou qualquer outro SNP da região (116). Embora o estudo de Birlea e cols. tenha utilizado uma grande amostra populacional (1392 casos e 2629 controles), características de desenho deste estudo dificultam a interpretação dos resultados, em especial o fato deste estudo estar fortemente baseado em uma re-análise de um GWAS.

Para o gene *COMT*, foi realizada análise de associação baseada em família entre vitiligo e polimorfismos do gene *COMT* que revelou associação estatisticamente significativa ($P = 0,01$) para o alelo “C” do SNP rs933271, com OR indicativo de proteção. Da mesma maneira que para o gene *FAS*, explorou-se um possível efeito de variáveis não genéticas sobre a associação observada para o polimorfismo rs933271 do gene *COMT* e um resultado inesperado foi a ausência de influência da forma clínica da doença sobre o sinal de associação observado – um efeito da forma clínica foi observado em estudos de associação já publicados entre vitiligo e polimorfismo do gene *COMT*, porém, para outro marcador, rs4680. Já o fato do sinal de associação para o rs933271 estar concentrado no grupo de pacientes sem doença autoimune associada está de acordo com a observação de que nenhum polimorfismo do gene *COMT* foi descrito em associação com alguma doença autoimune epidemiologicamente associada ao vitiligo. Ressaltamos que esta observação não é incomum: nenhum impacto da ocorrência de doenças autoimune foi observado para a associação do vitiligo com os genes *DDR1* e *XBP1* (73, 106). Ao estratificar a população por idade de início da doença, foi possível observar um efeito idade-dependente para o gene *COMT*: o alelo “C” do rs933271 está associado com proteção ao vitiligo, sendo o sinal de associação concentrado nos indivíduos com início precoce da doença (≤ 18 e ≤ 25 anos). Vale notar que o rs933271 do gene *COMT* é uma variante genética intrônica e não está em desequilíbrio de ligação com nenhum SNP funcional previamente descrito nos bancos de dados públicos.

Para o gene *COMT*, dois estudos independentes detectaram evidência significativa de associação entre vitiligo e o marcador rs4680 (*COMT*-158 G>A), sendo o original realizado em turcos (148) e o estudo de replicação subsequente em chineses da etnia Han (139). Nosso estudo não detectou o polimorfismo rs4680 associado com suscetibilidade ao vitiligo, e ainda, esse polimorfismo não está em DL

com o SNP rs933271 do gene *COMT* que mostrou evidência significativa de associação em nossa população (DL entre rs4680 e rs933271: $r^2 = 0,01$). Ressaltamos que o estudo realizado por Birlea e cols. falhou na replicação do gene *COMT* (Birlea, Jin et al., 2011).

Uma das razões para a não replicação da associação entre vitiligo e o marcador rs2234767 do gene *FAS*, tanto em nossa população quanto no estudo de Birlea e cols; como também para o marcador rs4680 do gene *COMT*, pode ser devido à diferença da estrutura dos blocos haplotípicos entre as populações européias e chinesas. Já foi descrito que populações com ascendência Africana apresentam blocos de DL menores em comparação aos europeus, e o tamanho de bloco entre os chineses e japoneses são comparáveis entre si, sendo de tamanho intermediário entre os europeus e africanos (95). Esta variabilidade pode dificultar a replicação dos achados de associação.

No entanto, DL não parece ser uma justificativa para a divergência de resultado tanto para o gene *FAS* quanto para o gene *COMT*, entre o presente estudo e o estudo de Birlea e cols. Outra razão para a não replicação entre os estudos de associação pode ser devido à característica da população. Estratificação da população em diferentes composições étnicas de casos e controles pode levar a uma associação espúria com a doença. Pesquisadores relataram que europeus são menos diversificado geneticamente e problemas com estratificação da população são menos comum nessa população; no entanto, entre grupos miscigenados, como os Afro-americanos, existe uma alta heterogeneidade genômica, resultando em *bias* nos estudos de associação (237). Neste contexto, torna-se desafiador estender a replicação do estudo de associação para populações com *background* genético diferente.

Tem sido discutido o fato de muitos marcadores genéticos estarem associados com uma determinada doença complexa em determinados estudos em uma população, e não ser observada necessariamente a mesma associação em outra – uma das razões para este efeito pode ser a heterogeneidade alélica (238). A frequência alélica de uma variante genética pode ser diferente entre as diferentes populações, e dado que o efeito genético de uma variante de suscetibilidade depende da frequência do alelo, pode ser esperado que uma associação

estatisticamente significativa em uma população não seja encontrada em outra. Por exemplo, para o marcador rs2234767 do gene *FAS*, na amostra populacional original de chineses, a frequência do alelo “A” (associado) foi de 0,38, enquanto que em nossa população a frequência do mesmo alelo foi de 0,17.

Diferentes polimorfismos dos genes *COMT* e *FAS* foram descritos em associação com o vitiligo, considerando o presente estudo e o estudo original, fato esse que não invalida o resultado da replicação, já que doenças complexas podem ser causadas por diferentes variantes de suscetibilidade em diferentes populações. Isso deve ser interpretado sob a perspectiva de que um refinamento na cobertura física dos genes *COMT* e *FAS* ainda deve ser realizado a fim de se identificar a variante causal. Nesse contexto, é importante mencionar que o sequenciamento do genoma completo, em breve, será uma realidade para se trabalhar em escala de amostragem populacional, o que poderá viabilizar a identificação de variantes genéticas responsáveis pela doença. Sendo assim, o presente estudo reforça o papel dos genes *FAS* e *COMT* como importantes genes candidatos envolvidos na patogênese do vitiligo.

6.3.2. *EDN1*

Nosso estudo não replicou a associação entre vitiligo e o gene *EDN1* originalmente descrita (134). Análise de associação baseada em família não detectou associação estatisticamente significativa entre três SNPs intragênico ao gene *EDN1* e vitiligo, bem como suas manifestações clínicas.

Estudos de associação entre variantes do gene *EDN1* e suscetibilidade ao vitiligo apresentaram resultados conflitantes. O estudo original de associação entre vitiligo e *EDN1* descreve uma associação somente para o haplótipo formado entre os SNPs rs2071942 e rs5370 do gene *EDN1* ($P < 0,0001$) (134). Dois estudos de replicação subsequentes, com amostra populacional independentes, falharam ao não replicar a associação para os SNPs rs2071942 e rs5370 (116, 216), resultados aos quais se soma o do presente estudo.

Atualmente tem sido amplamente discutido a não replicação de resultados de estudos de associação, e não podemos deixar de mencionar que ausência de

replicação pode ser devido a resultado falso-positivo devido associação espúria e/ou devido a limitações próprias do desenho do estudo original. Além disso, pode-se questionar a confiabilidade dos primeiros resultados positivos, pois se acredita que o resultado positivo inicial tem uma tendência a ser superestimado, conhecido como fenômeno de “*Winner’s Curse*” (237). Acreditamos que, nosso resultado, em combinação com dados concordantes de outros estudos recentes, sugerem fortemente o não envolvimento do gene *EDN1* no controle da suscetibilidade ao vitiligo, embora estudos de associação por si só não tem o poder de excluir o envolvimento de um gene em uma determinada característica.

6.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de o vitiligo ser uma das mais comuns doença despigmentante, com impacto evidente sobre a qualidade de vida dos indivíduos afetados, sua fisiopatogênese não está esclarecida. Nosso estudo utilizou um desenho baseado em família para testar associação dos genes *BCHE*, *FAS*, *COMT* e *EDN1* com vitiligo *per se* e suas manifestações clínicas, uma técnica que evita achado espúrio de associação causado por estratificação críptica da amostra populacional em estudo.

Nosso principal achado indica, a partir de estudo genético e funcional, o envolvimento de variantes genéticas do gene *BCHE*, em especial rs1803274, na patogênese do vitiligo. Complementar a isso, nossos achados também sugerem que variações no gene *FAS* são fatores de risco para vitiligo. As variantes genéticas replicadas a partir desse estudo para o gene *FAS* conferem um risco baixo a médio (OR: 1.5 – 2.2) para a suscetibilidade à doença. Adicionalmente, observamos um efeito idade dependente para associação do vitiligo com o gene *COMT*. Nenhuma evidência de associação foi encontrada entre variantes do gene *EDN1* e suscetibilidade a fenótipos do vitiligo.

A identificação das bases genéticas em doenças complexas é um desafio. Embora os estudos de replicação sejam valiosos e importantes, em alguns casos, podem não ser suficientes para validar os achados dos estudos de associação. A replicação de uma evidência de associação representa apenas o início do processo

de encontrar a(s) variante(s) genética(s) causal(is). Posteriormente será necessário sequenciar o intervalo que contém o polimorfismo estudado, genotipar todas as variantes comuns e raras e testar contra o desfecho de interesse em várias amostras populacionais, além de se buscar entender seu impacto funcional, potencial interação com outros genes ou fatores ambientais e possível impacto sobre estratégias de intervenções preventivas ou terapêuticas.

7. CONCLUSÕES

1. Foram identificados dois sinais independentes de associação entre vitiligo e o gene *BCHE* na amostra populacional de trios estudada, um deles representado pelo alelo de suscetibilidade “C” do marcador rs1355538 e o outro pelo alelo de proteção “A” do marcador rs1803274;
2. Para ambos os marcadores, a evidência positiva de associação estava concentrada no grupo de indivíduos com vitiligo não-segmentar e com presença de doença autoimune associada;
3. O sinal de associação de ambos os marcadores do *BCHE* é idade dependente: o efeito de suscetibilidade conferida pelo alelo “C” do rs1355538 está concentrado entre os casos de vitiligo tardio, e o efeito de proteção conferido pelo alelo “A” do marcador rs1803274 está concentrado nos casos de vitiligo precoce;
4. Associação entre alelo “A” do marcador rs1803274 e vitiligo foi replicada em uma amostra populacional caso-controle independente, formada por casos com vitiligo não-segmentar e presença de co-morbidade autoimune;
5. Nos pacientes com vitiligo, redução estatisticamente significativa na atividade da enzima BChE foi associada aos indivíduos apresentando o genótipo AA+AG do marcador rs1803274;
6. Foram identificados dois sinais independentes de associação entre vitiligo e o gene *FAS* na amostra populacional de trios estudada; sendo um deles representado pelo alelo “G” do marcador rs2243978 e o outro pelo alelo “A” do marcador rs4406738;
7. Para os polimorfismos estudados do gene *FAS*, aumento do risco foi evidenciado para o subgrupo com vitiligo não-segmentar e idade de início da doença ≤ 25 anos (rs4406738) e > 18 e ≤ 25 anos (rs2234978);
8. O Alelo “C” do polimorfismo rs933271 do gene *COMT* está associado com proteção ao vitiligo nas famílias estudadas, sendo a associação concentrada no subgrupo sem doenças autoimune epidemiologicamente associada ao vitiligo e início da doença ≤ 18 e ≤ 25 anos.

9. Os polimorfismos rs2070699, rs2071942 e rs5370 do gene *EDN1* não estão associado à suscetibilidade ao vitiligo e suas manifestações clínicas na amostra populacional estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nordlund JJ, Ortonne, Jean-Paul, Le Poole, I. Caroline. The pigmentary system : physiology and pathophysiology. 2nd ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub.; 2006.
2. Hann S-K, and Nordlund, J. Vitiligo: Blackwell; 2000.
3. Das SK, Majumder PP, Chakraborty R, Majumdar TK, Haldar B. Studies on vitiligo. I. Epidemiological profile in Calcutta, India. *Genet Epidemiol.* 1985;2(1):71-8.
4. Majumder PP, Das SK, Li CC. A genetical model for vitiligo. *Am J Hum Genet.* 1988 Aug;43(2):119-25.
5. Majumder PP, Nordlund JJ, Nath SK. Pattern of familial aggregation of vitiligo. *Arch Dermatol.* 1993 Aug;129(8):994-8.
6. Mehta NR, Shah KC, Theodore C, Vyas VP, Patel AB. Epidemiological study of vitiligo in Surat area, South Gujarat. *Indian J Med Res.* 1973 Jan;61(1):145-54.
7. Howitz J, Brodthagen H, Schwartz M, Thomsen K. Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Arch Dermatol.* 1977 Jan;113(1):47-52.
8. Fain PR, Gowan K, LaBerge GS, Alkhateeb A, Stetler GL, Talbert J, et al. A genomewide screen for generalized vitiligo: confirmation of AIS1 on chromosome 1p31 and evidence for additional susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* 2003 Jun;72(6):1560-4.
9. Nath SK, Majumder PP, Nordlund JJ. Genetic epidemiology of vitiligo: multilocus recessivity cross-validated. *Am J Hum Genet.* 1994 Nov;55(5):981-90.
10. 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 Res.* 2003 Jun;16(3):208-14.
11. 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. *Arch Dermatol Res.* 2009 Feb;301(2):167-73.
12. 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 Res.* 2005 Aug;18(4):300-5.
13. Taieb A, Picardo M. Clinical practice. Vitiligo. *N Engl J Med.* 2009 Jan 8;360(2):160-9.
14. Lerner AB. Vitiligo. *J Invest Dermatol.* 1959 Feb;32(2, Part 2):285-310.

15. Song MS, Hann SK, P.S. A, Im S, Park YK. Clinical study of vitiligo: comparative study of type A and type B vitiligo. *Annals of Dermatology*. 1994;6:22-30.
16. Porter JH, SK; Nordlund, J.J. The psychological effects of vitiligo: response to impaired appearance: Blackwell-Science; 2000.
17. Papadopoulos L, Bor R, Legg C, Hawk JL. Impact of life events on the onset of vitiligo in adults: preliminary evidence for a psychological dimension in aetiology. *Clin Exp Dermatol*. 1998 Nov;23(6):243-8.
18. Radtke MA, Schafer I, Gajur A, Langenbruch A, Augustin M. Willingness-to-pay and quality of life in patients with vitiligo. *Br J Dermatol*. 2009 Mar 9.
19. Kostopoulou P, Jouary T, Quintard B, Ezzedine K, Marques S, Boutchnei S, et al. Objective vs. subjective factors in the psychological impact of vitiligo: the experience from a French referral centre. *Br J Dermatol*. 2009 Mar 9.
20. Mills MD ADH, SK; Nordlund, J.J. . Ocular and otic findings in Vitiligo. In: *Vitiligo.*: Blackwell-Science 2000.
21. Schallreuter KU, Tobin DJ, Panske A. Decreased photodamage and low incidence of non-melanoma skin cancer in 136 sun-exposed caucasian patients with vitiligo. *Dermatology*. 2002;204(3):194-201.
22. Calanchini-Postizzi E, Frenk E. Long-term actinic damage in sun-exposed vitiligo and normally pigmented skin. *Dermatologica*. 1987;174(6):266-71.
23. Hexsel CL, Eide MJ, Johnson CC, Krajenta R, Jacobsen G, Hamzavi I, et al. Incidence of nonmelanoma skin cancer in a cohort of patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Jun;60(6):929-33.
24. Schallreuter KU, Behrens-Williams S, Khaliq TP, Picksley SM, Peters EM, Marles LK, et al. Increased epidermal functioning wild-type p53 expression in vitiligo. *Exp Dermatol*. 2003 Jun;12(3):268-77.
25. Dammak I, Boudaya S, Ben Abdallah F, Turki H, Attia H, Hentati B. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation at the tissue level in patients with stable and active vitiligo. *Int J Dermatol*. 2009 May;48(5):476-80.
26. Feily A, Pazyar N. Why vitiligo is associated with fewer risk of skin cancer? Providing a molecular mechanism. *Arch Dermatol Res*. 2011 Aug 10.
27. Karayiorgou M, Altemus M, Galke BL, Goldman D, Murphy DL, Ott J, et al. Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;94(9):4572-5.
28. Freilich AR. Tzaraat--"biblical leprosy". *J Am Acad Dermatol*. 1982 Jan;6(1):131-4.

29. Kopera D. History and Cultural aspects of Vitiligo. In: Vitiligo (eds. Hann, SK.; Nordlund, J.J.): Blackwell-Science. Oxford; 2000.
30. Gawkrödger DJ, Ormerod AD, Shaw L, Mauri-Sole I, Whitton ME, Watts MJ, et al. Vitiligo: concise evidence based guidelines on diagnosis and management. *Postgrad Med J*. 2011 Aug;86(1018):466-71.
31. Gawkrödger DJ, Ormerod AD, Shaw L, Mauri-Sole I, Whitton ME, Watts MJ, et al. Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. *Br J Dermatol*. 2008 Nov;159(5):1051-76.
32. Hann SK, Lee HJ. Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Nov;35(5 Pt 1):671-4.
33. Koga M, Tango T. Clinical features and course of type A and type B vitiligo. *Br J Dermatol*. 1988 Feb;118(2):223-8.
34. Taieb A, Picardo M. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res*. 2007 Feb;20(1):27-35.
35. Gauthier Y, Cario Andre M, Taieb A. A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Res*. 2003 Aug;16(4):322-32.
36. 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. *J Dermatol Sci*. 2012 Jan;65(1):63-7.
37. Cho S, Kang HC, Hahm JH. Characteristics of vitiligo in Korean children. *Pediatr Dermatol*. 2000 May-Jun;17(3):189-93.
38. el-Mofty AM, el-Mofty M. Vitiligo. A symptom complex. *Int J Dermatol*. 1980 Jun;19(5):237-44.
39. Schallreuter KU, Lemke R, Brandt O, Schwartz R, Westhofen M, Montz R, et al. Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. *Dermatology*. 1994;188(4):269-75.
40. Ortonne BPFTBJP. Vitiligo. In: *Dermatology in General Medicine* 6° ed. New York: McGraw-Hill; 2005.
41. Dell'anna ML, Picardo M. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Res*. 2006 Oct;19(5):406-11.
42. Castanet J, Ortonne JP. Pathophysiology of vitiligo. *Clin Dermatol*. 1997 Nov-Dec;15(6):845-51.

43. Boone B, Ongenaes K, Van Geel N, Vernijns S, De Keyser S, Naeyaert JM. Topical pimecrolimus in the treatment of vitiligo. *Eur J Dermatol*. 2007 Jan-Feb;17(1):55-61.
44. Hann SK, Kim HI, Im S, Park YK, Cui J, Bystryn JC. The change of melanocyte cytotoxicity after systemic steroid treatment in vitiligo patients. *J Dermatol Sci*. 1993 Dec;6(3):201-5.
45. Rezaei N, Gavalas NG, Weetman AP, Kemp EH. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007 Aug;21(7):865-76.
46. Norris DA, Kissinger RM, Naughton GM, Bystryn JC. Evidence for immunologic mechanisms in human vitiligo: patients' sera induce damage to human melanocytes in vitro by complement-mediated damage and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Invest Dermatol*. 1988 Jun;90(6):783-9.
47. Ruiz-Arguelles A, Brito GJ, Reyes-Izquierdo P, Perez-Romano B, Sanchez-Sosa S. Apoptosis of melanocytes in vitiligo results from antibody penetration. *J Autoimmun*. 2007 Dec;29(4):281-6.
48. Gilhar A, Zelickson B, Ulman Y, Etzioni A. In vivo destruction of melanocytes by the IgG fraction of serum from patients with vitiligo. *J Invest Dermatol*. 1995 Nov;105(5):683-6.
49. Harning R, Cui J, Bystryn JC. Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 1991 Dec;97(6):1078-80.
50. Naughton GK, Reggiardo D, Bystryn JC. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 1986 Nov;15(5 Pt 1):978-81.
51. van den Wijngaard R, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole C, Tigges B, Westerhof W, Das P. Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. *Lab Invest*. 2000 Aug;80(8):1299-309.
52. Le Poole IC, Mutis T, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Ottenhoff T, de Vries RR, et al. A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J Immunol*. 1993 Dec 15;151(12):7284-92.
53. Ogg GS, Rod Dunbar P, Romero P, Chen JL, Cerundolo V. High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med*. 1998 Sep 21;188(6):1203-8.
54. van den Boorn JG, Konijnenberg D, DelleMijn TA, van der Veen JP, Bos JD, Melief CJ, et al. Autoimmune Destruction of Skin Melanocytes by Perilesional T Cells from Vitiligo Patients. *J Invest Dermatol*. 2009 Feb 26.

55. Grando SA, Pittelkow MR, Schallreuter KU. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol.* 2006 Sep;126(9):1948-65.
56. Jimbow K, Chen H, Park JS, Thomas PD. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *Br J Dermatol.* 2001 Jan;144(1):55-65.
57. Schallreuter KU, Elwary S. Hydrogen peroxide regulates the cholinergic signal in a concentration dependent manner. *Life Sci.* 2007 May 30;80(24-25):2221-6.
58. Schallreuter KU, Gibbons NC, Zothner C, Elwary SM, Rokos H, Wood JM. Butyrylcholinesterase is present in the human epidermis and is regulated by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 27;349(3):931-8.
59. Hasse S, Gibbons NC, Rokos H, Marles LK, Schallreuter KU. Perturbed 6-tetrahydrobiopterin recycling via decreased dihydropteridine reductase in vitiligo: more evidence for H₂O₂ stress. *J Invest Dermatol.* 2004 Feb;122(2):307-13.
60. Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Buttner G, Swanson N, Korner C, et al. Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo. *Arch Dermatol Res.* 1996;288(1):14-8.
61. Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC, Tobin DJ, et al. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1999 Sep;4(1):91-6.
62. Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Gutlich M, Lemke KR, Rodl W, et al. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science.* 1994 Mar 11;263(5152):1444-6.
63. Schallreuter KU, Wood JM, Ziegler I, Lemke KR, Pittelkow MR, Lindsey NJ, et al. Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo. *Biochim Biophys Acta.* 1994 May 25;1226(2):181-92.
64. Morrone A, Picardo M, de Luca C, Terminali O, Passi S, Ippolito F. Catecholamines and vitiligo. *Pigment Cell Res.* 1992 Mar;5(2):65-9.
65. Schallreuter KU, Elwary SM, Gibbons NC, Rokos H, Wood JM. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 5;315(2):502-8.
66. Passi S, Grandinetti M, Maggio F, Stancato A, De Luca C. Epidermal oxidative stress in vitiligo. *Pigment Cell Res.* 1998 Apr;11(2):81-5.
67. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):843-50.

68. Picardo M, Passi S, Morrone A, Grandinetti M, Di Carlo A, Ippolito F. Antioxidant status in the blood of patients with active vitiligo. *Pigment Cell Res.* 1994 Apr;7(2):110-5.
69. Huang CL, Nordlund JJ, Boissy R. Vitiligo: a manifestation of apoptosis? *Am J Clin Dermatol.* 2002;3(5):301-8.
70. Lee AY, Youm YH, Kim NH, Yang H, Choi WI. Keratinocytes in the depigmented epidermis of vitiligo are more vulnerable to trauma (suction) than keratinocytes in the normally pigmented epidermis, resulting in their apoptosis. *Br J Dermatol.* 2004 Nov;151(5):995-1003.
71. Lee AY, Kim NH, Choi WI, Youm YH. Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2005 May;124(5):976-83.
72. Morelli JG, Norris DA. Influence of inflammatory mediators and cytokines on human melanocyte function. *J Invest Dermatol.* 1993 Feb;100(2 Suppl):191S-5S.
73. 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. *J Invest Dermatol.* 2010 Jul;130(7):1813-8.
74. Fukunaga-Kalabis M, Martinez G, Liu ZJ, Kalabis J, Mrass P, Weninger W, et al. CCN3 controls 3D spatial localization of melanocytes in the human skin through DDR1. *J Cell Biol.* 2006 Nov 20;175(4):563-9.
75. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science.* 1994 Sep 30;265(5181):2037-48.
76. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet.* 2005 Sep 10-16;366(9489):941-51.
77. Nussbaum RL, McInnes, R.R., Willard, H.F. Thompson & Thompson, *Genética Médica*. 7.ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
78. Strachan TeRAP. *Genética Molecular Humana*. 2.ed. ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2002.
79. Hopper JL, Bishop DT, Easton DF. Population-based family studies in genetic epidemiology. *Lancet.* 2005 Oct 15-21;366(9494):1397-406.
80. Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered.* 1971;21(6):523-42.

81. Lazaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis.* 2010 May 15;201(10):1598-605.
82. Werneck RI, Lazaro FP, Cobat A, Grant AV, Xavier MB, Abel L, et al. A major gene effect controls resistance to caries. *J Dent Res.* 2011 Jun;90(6):735-9.
83. Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet.* 2005 Sep 17-23;366(9490):1036-44.
84. Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet.* 1955 Sep;7(3):277-318.
85. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet.* 1995 Nov;11(3):241-7.
86. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet.* 2005 Sep 24-30;366(9491):1121-31.
87. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 1993 Mar;52(3):506-16.
88. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *Jama.* 2008 Mar 19;299(11):1335-44.
89. Kingsmore SF, Lindquist IE, Mudge J, Gessler DD, Beavis WD. Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Mar;7(3):221-30.
90. Ridley M. *Evolução.* 3.ed. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
91. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.* 2006 Oct;7(10):781-91.
92. Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* 2008 Jun;9(6):477-85.
93. Cardon LR, Abecasis GR. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet.* 2003 Mar;19(3):135-40.
94. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet.* 2001 Oct;29(2):229-32.
95. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002 Jun 21;296(5576):2225-9.

96. Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1072-9.
97. The International HapMap Project. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):789-96.
98. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):851-61.
99. Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010 Sep 2;467(7311):52-8.
100. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002 May;3(5):391-7.
101. Spritz RA, Gowan K, Bennett DC, Fain PR. Novel vitiligo susceptibility loci on chromosomes 7 (AIS2) and 8 (AIS3), confirmation of SLEV1 on chromosome 17, and their roles in an autoimmune diathesis. *Am J Hum Genet*. 2004 Jan;74(1):188-91.
102. Chen JJ, Huang W, Gui JP, Yang S, Zhou FS, Xiong QG, et al. A novel linkage to generalized vitiligo on 4q13-q21 identified in a genomewide linkage analysis of Chinese families. *Am J Hum Genet*. 2005 Jun;76(6):1057-65.
103. Liang Y, Yang S, Zhou Y, Gui J, Ren Y, Chen J, et al. Evidence for Two Susceptibility Loci on Chromosomes 22q12 and 6p21-p22 in Chinese Generalized Vitiligo Families. *J Invest Dermatol*. 2007 Jun 14.
104. 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. *Nat Genet*. 2010 Jul;42(7):614-8.
105. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2007 Mar 22;356(12):1216-25.
106. Ren Y, Yang S, Xu S, Gao M, Huang W, Gao T, et al. Genetic variation of promoter sequence modulates XBP1 expression and genetic risk for vitiligo. *PLoS Genet*. 2009 Jun;5(6):e1000523.
107. Arcos-Burgos M, Parodi E, Salgar M, Bedoya E, Builes J, Jaramillo D, et al. Vitiligo: complex segregation and linkage disequilibrium analyses with respect to microsatellite loci spanning the HLA. *Hum Genet*. 2002 Apr;110(4):334-42.
108. Zhang XJ, Liu JB, Gui JP, Li M, Xiong QG, Wu HB, et al. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Sep;51(3):383-90.

109. Tripathi RK, Flanders DJ, Young TL, Oetting WS, Ramaiah A, King RA, et al. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) locus lacks linkage to human vitiligo or osteopetrosis: an evaluation. *Pigment Cell Res.* 1999 Jun;12(3):187-92.
110. Nath SK, Kelly JA, Namjou B, Lam T, Bruner GR, Scofield RH, et al. Evidence for a susceptibility gene, SLEV1, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.* 2001 Dec;69(6):1401-6.
111. Alkhateeb A, Stetler GL, Old W, Talbert J, Uhlhorn C, Taylor M, et al. Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-p32.2. *Hum Mol Genet.* 2002 Mar 15;11(6):661-7.
112. Alkhateeb A, Fain PR, Spritz RA. Candidate functional promoter variant in the FOXD3 melanoblast developmental regulator gene in autosomal dominant vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2005 Aug;125(2):388-91.
113. 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. *Dis Markers.* 2008;24(1):51-7.
114. Aksoy SN, Erbagci Z, Saygili EI, Sever T, Erbagci AB, Pehlivan S. Analysis of myeloperoxidase promoter polymorphism and enzyme activity in Turkish patients with vitiligo. *Eur J Dermatol.* 2009 Nov-Dec;19(6):576-80.
115. Alkhateeb A, Qarqaz F. Genetic association of NALP1 with generalized vitiligo in Jordanian Arabs. *Arch Dermatol Res.* 2010 Jun 24.
116. 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. *J Invest Dermatol.* 2011 Feb;131(2):371-81.
117. Birlea SA, Laberge GS, Procopciuc LM, Fain PR, Spritz RA. CTLA4 and generalized vitiligo: two genetic association studies and a meta-analysis of published data. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009 Apr;22(2):230-4.
118. Blomhoff A, Kemp EH, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Husebye ES, Akselsen HE, et al. CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases. *Pigment Cell Res.* 2005 Feb;18(1):55-8.
119. 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 Immun.* 2005 Oct;6(7):584-7.
120. Casp CB, She JX, McCormack WT. Genes of the LMP/TAP cluster are associated with the human autoimmune disease vitiligo. *Genes Immun.* 2003 Oct;4(7):492-9.

121. Casp CB, She JX, McCormack WT. Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res.* 2002 Feb;15(1):62-6.
122. Douroudis K, Kingo K, Karelson M, Silm H, Reimann E, Traks T, et al. The PRO2268 gene as a novel susceptibility locus for vitiligo. *Acta Derm Venereol.* 2011 Mar;91(2):189-91.
123. Dwivedi M, Gupta K, Gulla KC, Laddha NC, Hajela K, Begum R. Lack of genetic association of promoter and structural variants of mannan-binding lectin (MBL2) gene with susceptibility to generalized vitiligo. *Br J Dermatol.* 2009 Jul;161(1):63-9.
124. Dwivedi M, Laddha NC, Shajil EM, Shah BJ, Begum R. The ACE gene I/ D polymorphism is not associated with generalized vitiligo susceptibility in Gujarat population. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Jun;21(3):407-8.
125. Em S, Laddha NC, Chatterjee S, Gani AR, Malek RA, Shah BJ, et al. Association of catalase T/C exon 9 and glutathione peroxidase codon 200 polymorphisms in relation to their activities and oxidative stress with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *Pigment Cell Res.* 2007 Oct;20(5):405-7.
126. Guan CP, Zhou MN, Xu AE, Kang KF, Liu JF, Wei XD, et al. The susceptibility to vitiligo is associated with NF-E2-related factor2 (Nrf2) gene polymorphisms: a study on Chinese Han population. *Exp Dermatol.* 2008 Dec;17(12):1059-62.
127. Jeong KH, Shin MK, Uhm YK, Kim HJ, Chung JH, Lee MH. Association of TXNDC5 gene polymorphisms and susceptibility to nonsegmental vitiligo in the Korean population. *Br J Dermatol.* 2010 Apr;162(4):759-64.
128. Jeong TJ, Shin MK, Uhm YK, Kim HJ, Chung JH, Lee MH. Association of UVRAG polymorphisms with susceptibility to non-segmental vitiligo in a Korean sample. *Exp Dermatol.* 2010 Aug;19(8):e323-5.
129. Jin SY, Park HH, Li GZ, Lee HJ, Hong MS, Hong SJ, et al. Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism of vitiligo in Korean population. *Pigment Cell Res.* 2004 Feb;17(1):84-6.
130. Jin SY, Park HH, Li GZ, Lee HJ, Hong MS, Park HJ, et al. Association of estrogen receptor 1 intron 1 C/T polymorphism in Korean vitiligo patients. *J Dermatol Sci.* 2004 Sep;35(3):181-6.
131. Jin Y, Bennett DC, Amadi-Myers A, Holland P, Riccardi SL, Gowan K, et al. Vitiligo-associated multiple autoimmune disease is not associated with genetic variation in AIRE. *Pigment Cell Res.* 2007 Oct;20(5):402-4.
132. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *J Invest Dermatol.* 2007 Nov;127(11):2558-62.

133. Kemp EH, Ajjan RA, Waterman EA, Gawkrödger DJ, Cork MJ, Watson PF, et al. Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. *Br J Dermatol*. 1999 Jan;140(1):73-8.
134. Kim HJ, Choi CP, Uhm YK, Kim YI, Lee JW, Yoon SH, et al. The association between endothelin-1 gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo in a Korean population. *Exp Dermatol*. 2007 Jul;16(7):561-6.
135. Kim HJ, Uhm YK, Yun JY, Im SH, Yim SV, Chung JH, et al. Association between polymorphisms of discoidin domain receptor tyrosine kinase 1 (DDR1) and non-segmental vitiligo in the Korean population. *Eur J Dermatol*. 2010 Mar-Apr;20(2):231-2.
136. LaBerge GS, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. PTPN22 is genetically associated with risk of generalized vitiligo, but CTLA4 is not. *J Invest Dermatol*. 2008 Jul;128(7):1757-62.
137. 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 Res*. 2008 Apr;21(2):206-8.
138. Laddha NC, Dwivedi M, Shajil EM, Prajapati H, Marfatia YS, Begum R. Association of PTPN22 1858C/T polymorphism with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *J Dermatol Sci*. 2008 Mar;49(3):260-2.
139. Li K, Li C, Gao L, Yang L, Li M, Liu L, et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene alter vitiligo risk in a Chinese population. *Arch Dermatol Res*. 2009 Oct;301(9):681-7.
140. Li M, Gao Y, Li C, Liu L, Li K, Gao L, et al. Association of COX2 functional polymorphisms and the risk of vitiligo in Chinese populations. *J Dermatol Sci*. 2009 Mar;53(3):176-81.
141. 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. *J Invest Dermatol*. 2008 Dec;128(12):2820-4.
142. Liu L, Li C, Gao J, Li K, Gao L, Gao T. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase and risk of vitiligo in the Chinese population. *J Invest Dermatol*. 2009 Nov;129(11):2646-52.
143. Lv Y, Liao W, Luan Q, Wang H, Wang L, Li Q. The polymorphism of catalase T/C codon 389 in exon 9 and vitiligo susceptibility: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Nov 4.
144. 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. *Eur J Dermatol*. 2009 Mar-Apr;19(2):126-8.

145. Philips MA, Kingo K, Karelson M, Ratsep R, Aunin E, Reimann E, et al. Promoter polymorphism -119C/G in MYG1 (C12orf10) gene is related to vitiligo susceptibility and Arg4Gln affects mitochondrial entrance of Myg1. *BMC Med Genet.* 2010;11:56.
146. Szell M, Baltas E, Bodai L, Bata-Csorgo Z, Nagy N, Dallos A, et al. The Arg160Trp allele of melanocortin-1 receptor gene might protect against vitiligo. *Photochem Photobiol.* 2008 May-Jun;84(3):565-71.
147. Tazi-Ahnini R, McDonagh AJ, Wengraf DA, Lovewell TR, Vasilopoulos Y, Messenger AG, et al. The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. *Br J Dermatol.* 2008 Sep;159(3):591-6.
148. Tursen U, Kaya TI, Erdal ME, Derici E, Gunduz O, Ikizoglu G. Association between catechol-O-methyltransferase polymorphism and vitiligo. *Arch Dermatol Res.* 2002 May;294(3):143-6.
149. Yazici AC, Erdal ME, Kaya TI, Ikizoglu G, Savasoglu K, Camdeviren H, et al. Lack of association with TNF-alpha-308 promoter polymorphism in patients with vitiligo. *Arch Dermatol Res.* 2006 Jun;298(1):46-9.
150. Yun JY, Uhm YK, Kim HJ, Lim SH, Chung JH, Shin MK, et al. Transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) polymorphisms and the association with nonsegmental vitiligo in the Korean population. *Int J Immunogenet.* 2010 Aug;37(4):289-91.
151. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 2000 Jun 15;405(6788):847-56.
152. Foley LM, Lowe NJ, Misheloff E, Tiwari JL. Association of HLA-DR4 with vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 1983 Jan;8(1):39-40.
153. al-Fouzan A, al-Arbash M, Fouad F, Kaaba SA, Mousa MA, al-Harbi SA. Study of HLA class I/IL and T lymphocyte subsets in Kuwaiti vitiligo patients. *Eur J Immunogenet.* 1995 Apr;22(2):209-13.
154. Finco O, Cuccia M, Martinetti M, Ruberto G, Orecchia G, Rabbiosi G. Age of onset in vitiligo: relationship with HLA supratypes. *Clin Genet.* 1991 Jan;39(1):48-54.
155. Dunston GM, Halder RM. Vitiligo is associated with HLA-DR4 in black patients. A preliminary report. *Arch Dermatol.* 1990 Jan;126(1):56-60.
156. Metzker A, Zamir R, Gazit E, David M, Feuerman EJ. Vitiligo and the HLA system. *Dermatologica.* 1980;160(2):100-5.
157. Orecchia G, Perfetti L, Malagoli P, Borghini F, Kipervarg Y. Vitiligo is associated with a significant increase in HLA-A30, Cw6 and DQw3 and a decrease in C4AQ0 in northern Italian patients. *Dermatology.* 1992;185(2):123-7.

158. Lorini R, Orecchia G, Martinetti M, Dugoujon JM, Cuccia M. Autoimmunity in vitiligo: relationship with HLA, Gm and Km polymorphisms. *Autoimmunity*. 1992;11(4):255-60.
159. Venkataram MN, White AG, Leeny WA, al Suwaid AR, Daar AS. HLA antigens in Omani patients with vitiligo. *Clin Exp Dermatol*. 1995 Jan;20(1):35-7.
160. Venneker GT, Westerhof W, de Vries IJ, Drayer NM, Wolthers BG, de Waal LP, et al. Molecular heterogeneity of the fourth component of complement (C4) and its genes in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 1992 Dec;99(6):853-8.
161. Tastan HB, Akar A, Orkunoglu FE, Arca E, Inal A. Association of HLA class I antigens and HLA class II alleles with vitiligo in a Turkish population. *Pigment Cell Res*. 2004 Apr;17(2):181-4.
162. Misri R, Khopkar U, Shankarkumar U, Ghosh K. Comparative case control study of clinical features and human leukocyte antigen susceptibility between familial and nonfamilial vitiligo. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2009 Nov-Dec;75(6):583-7.
163. Liu JB, Li M, Chen H, Zhong SQ, Yang S, Du WD, et al. Association of vitiligo with HLA-A2: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007 Feb;21(2):205-13.
164. Zamani M, Spaepen M, Sghar SS, Huang C, Westerhof W, Nieuweboer-Krobotova L, et al. Linkage and association of HLA class II genes with vitiligo in a Dutch population. *Br J Dermatol*. 2001 Jul;145(1):90-4.
165. Buc M, Fazekasova H, Cechova E, Hegyi E, Kolibasova K, Ferencik S. Occurrence rates of HLA-DRB1, HLA-DQB1, and HLA-DPB1 alleles in patients suffering from vitiligo. *Eur J Dermatol*. 1998 Jan-Feb;8(1):13-5.
166. Fain PR, Babu SR, Bennett DC, Spritz RA. HLA class II haplotype DRB1*04-DQB1*0301 contributes to risk of familial generalized vitiligo and early disease onset. *Pigment Cell Res*. 2006 Feb;19(1):51-7.
167. Xia Q, Zhou WM, Liang YH, Ge HS, Liu HS, Wang JY, et al. MHC haplotypic association in Chinese Han patients with vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006 Sep;20(8):941-6.
168. Wang J, Zhao YM, Wang Y, Xiao Y, Wang YK, Chen HD. [Association of HLA class I and II alleles with generalized vitiligo in Chinese Hans in north China]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2007 Apr;24(2):221-3.
169. Hu DY, Ren YQ, Zhu KJ, Lv YM, Cheng H, Zhang Z, et al. Comparisons of clinical features of HLA-DRB1*07 positive and negative vitiligo patients in Chinese Han population. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011 Jan 17.

170. Singh A, Sharma P, Kar HK, Sharma VK, Tembhre MK, Gupta S, et al. HLA Alleles and Amino-Acid Signatures of the Peptide-Binding Pockets of HLA Molecules in Vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2011 Aug 11.
171. Birlea SA, Gowan K, Fain PR, Spritz RA. Genome-wide association study of generalized vitiligo in an isolated European founder population identifies SMOC2, in close proximity to IDDM8. *J Invest Dermatol*. 2009 Mar;130(3):798-803.
172. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Gowan K, Riccardi SL, Holland PJ, et al. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *N Engl J Med*. 2010 May 6;362(18):1686-97.
173. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Mailloux CM, Riccardi SL, Gowan K, et al. Common variants in FOXP1 are associated with generalized vitiligo. *Nat Genet*. 2010 Jul;42(7):576-8.
174. 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. *J Invest Dermatol*. 2011 Jun;131(6):1308-12.
175. Zhang XJ, Liu HS, Liang YH, Sun LD, Wang JY, Yang S, et al. Association of HLA class I alleles with vitiligo in Chinese Hans. *J Dermatol Sci*. 2004 Aug;35(2):165-8.
176. 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. *Nat Genet*. 2009 Nov;41(11):1234-7.
177. Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*. 1990 Jan 9;29(1):124-31.
178. Harris H, Hopkinson DA, Robson EB, Whittaker M. Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. *Ann Hum Genet*. 1963 Jun;26:359-82.
179. Chautard-Freire-Maia EA, Primo-Parmo SL, Picheth G, Lourenco MA, Vieira MM. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum Hered*. 1991;41(5):330-9.
180. Evans FT, Gray PW, Lehmann H, Silk E. Sensitivity to succinylcholine in relation to serum-cholinesterase. *Lancet*. 1952 Jun 21;1(6721):1229-30.
181. Alcantara VM, Oliveira LC, Rea RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(3):285-8.

182. Alcantara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC, Chautard-Freire-Maia EA. Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. *Hum Biol.* 2001 Aug;73(4):587-95.
183. Alcantara VM, Oliveira LC, Rea RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5-phenotypes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Dec;27(12):1557-64.
184. Souza RL, Fadel-Picheth C, Allebrandt KV, Furtado L, Chautard-Freire-Maia EA. Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. *Am J Phys Anthropol.* 2005 Mar;126(3):329-34.
185. Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 1997 Oct;6(11):1933-6.
186. Souza RL, Mikami LR, Maegawa RO, Chautard-Freire-Maia EA. Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol Genet Metab.* 2005 Apr;84(4):349-53.
187. Gomes HJP, Souza RLR, Prevedello FC, Mira MT, Maia EAC-F. Investigation of Association between Susceptibility to Leprosy and SNPs inside and near the BCHE Gene of Butyrylcholinesterase. *Journal of Tropical Medicine.* 2012;doi:10.1155/2012/184819.
188. Alcantara VM, Chautard-Freire-Maia EA, Scartezini M, Cerci MS, Braun-Prado K, Picheth G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002;62(5):399-404.
189. Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T. E1k, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet.* 1978 Feb;15(1):27-9.
190. Souza RL, Castro RM, Pereira L, Freund AA, Culpi L, Chautard-Freire-Maia EA. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. *Hum Biol.* 1998 Oct;70(5):965-70.
191. Hashim Y, Shepherd D, Wiltshire S, Holman RR, Levy JC, Clark A, et al. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3 q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. *Diabetologia.* 2001 Dec;44(12):2227-30.
192. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Entezami H, Kharrazi H, Bahrhemand F, Tavilani H, et al. Butyrylcholinesterase K variants increase the risk of coronary artery disease in the population of western Iran. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68(2):123-9.
193. Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem.* 1992 May 25;267(15):10709-15.

194. Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther.* 2000 Dec;88(3):333-47.
195. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:269-90.
196. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16.
197. Fukuyama H, Adachi M, Suematsu S, Miwa K, Suda T, Yoshida N, et al. Requirement of Fas expression in B cells for tolerance induction. *Eur J Immunol.* 2002 Jan;32(1):223-30.
198. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular.* 6a. ed; 2008.
199. Lambe T, Leung JC, Bouriez-Jones T, Silver K, Makinen K, Crockford TL, et al. CD4 T cell-dependent autoimmunity against a melanocyte neoantigen induces spontaneous vitiligo and depends upon Fas-Fas ligand interactions. *J Immunol.* 2006 Sep 1;177(5):3055-62.
200. Kim NH, Jeon S, Lee HJ, Lee AY. Impaired PI3K/Akt activation-mediated NF-kappaB inactivation under elevated TNF-alpha is more vulnerable to apoptosis in vitiliginous keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007 Nov;127(11):2612-7.
201. Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A, Otsuka T, Takeuchi T, Nagayama J, et al. A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002 Jun;29(6):1183-8.
202. Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL, et al. Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2003 Aug 1;63(15):4327-30.
203. Mullighan CG, Heatley S, Lester S, Rischmueller M, Gordon TP, Bardy PG. Fas gene promoter polymorphisms in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2004 Jan;63(1):98-101.
204. Nolsoe RL, Kelly JA, Pociot F, Moser KL, Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T, et al. Functional promoter haplotypes of the human FAS gene are associated with the phenotype of SLE characterized by thrombocytopenia. *Genes Immun.* 2005 Dec;6(8):699-706.
205. Agarwal K, Czaja AJ, Donaldson PT. A functional Fas promoter polymorphism is associated with a severe phenotype in type 1 autoimmune hepatitis characterized by early development of cirrhosis. *Tissue Antigens.* 2007 Mar;69(3):227-35.

206. Geleijns K, Laman JD, van Rijs W, Tio-Gillen AP, Hintzen RQ, van Doorn PA, et al. Fas polymorphisms are associated with the presence of anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol.* 2005 Apr;161(1-2):183-9.
207. Grossman MH, Emanuel BS, Budarf ML. Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1----q11.2. *Genomics.* 1992 Apr;12(4):822-5.
208. Jeffery DR, Roth JA. Characterization of membrane-bound and soluble catechol-O-methyltransferase from human frontal cortex. *J Neurochem.* 1984 Mar;42(3):826-32.
209. Pavel S, Muskiet FA, de Ley L, The TH, van der Slik W. Identification of three indolic compounds in a pigmented-melanoma cell-culture supernatant by gas chromatography-mass spectrometry. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1983;105(3):275-9.
210. Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Smit NP, Oosting J, Westerhof W, Pavel S. Catechol-O-methyltransferase in vitiligo. *Arch Dermatol Res.* 1994;286(2):81-6.
211. Cucchi ML, Frattini P, Santagostino G, Preda S, Orecchia G. Catecholamines increase in the urine of non-segmental vitiligo especially during its active phase. *Pigment Cell Res.* 2003 Apr;16(2):111-6.
212. Harrison PJ, Tunbridge EM. Catechol-O-methyltransferase (COMT): a gene contributing to sex differences in brain function, and to sexual dimorphism in the predisposition to psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Dec;33(13):3037-45.
213. Foltynie T, Goldberg TE, Lewis SG, Blackwell AD, Kolachana BS, Weinberger DR, et al. Planning ability in Parkinson's disease is influenced by the COMT val158met polymorphism. *Mov Disord.* 2004 Aug;19(8):885-91.
214. Woo JM, Yoon KS, Yu BH. Catechol O-methyltransferase genetic polymorphism in panic disorder. *Am J Psychiatry.* 2002 Oct;159(10):1785-7.
215. Yohn JJ, Morelli JG, Walchak SJ, Rundell KB, Norris DA, Zamora MR. Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *J Invest Dermatol.* 1993 Jan;100(1):23-6.
216. Lan CC, Ko YC, Tu HP, Wu CS, Lee CH, Wu CS, et al. Association study between keratinocyte-derived growth factor gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo vulgaris in a Taiwanese population: potential involvement of stem cell factor. *Br J Dermatol.* 2009 Jun;160(6):1180-7.
217. Jin JJ, Nakura J, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Tabara Y, et al. Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension.* 2003 Jan;41(1):163-7.

218. Teplyakov AI. Endothelin-1 involved in systemic cytokine network inflammatory response at atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Nov;44 Suppl 1:S274-5.
219. Kozak M, Holla LI, Krivan L, Vasku A, Sepsi M, Borivoj S, et al. Endothelin-1 gene polymorphism in the identification of patients at risk for malignant ventricular arrhythmia. *Med Sci Monit.* 2002 May;8(5):BR164-7.
220. Vasku A, Spinarova L, Goldbergova M, Muzik J, Spinar J, Vitovec J, et al. The double heterozygote of two endothelin-1 gene polymorphisms (G8002A and -3A/-4A) is related to big endothelin levels in chronic heart failure. *Exp Mol Pathol.* 2002 Dec;73(3):230-3.
221. John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991 Jan 25;19(2):408.
222. Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis(nitrobenzoic acid)procedure. *Clin Chem.* 1973 Nov;19(11):1309-13.
223. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. *Eur J Hum Genet.* 2001 Apr;9(4):301-6.
224. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2):263-5.
225. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers.* 2009;27(3):173-86.
226. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med.* 2010 Jul 8;363(2):166-76.
227. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet.* 2005 Oct 8;366(9493):1315-23.
228. Lepienski LM, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA, Alcantara VM, Rea RR. Variant K of butyrylcholinesterase and risk of early-onset type 1 diabetes mellitus in Euro-Brazilians. *Diabetes Obes Metab.* 2006 Nov;8(6):709-11.
229. Holmes C, Ballard C, Lehmann D, David Smith A, Beaumont H, Day IN, et al. Rate of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease: effect of butyrylcholinesterase K gene variation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 May;76(5):640-3.
230. Lin SL, Miller JD, Ying SY. Intronic MicroRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006(4):26818.

231. Lin SL, Ying SY. Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. *Methods Mol Biol.* 2006;342:295-312.
232. Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, van der Spek AF, Rubinstein HM, Lubrano T, et al. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am J Hum Genet.* 1992 May;50(5):1086-103.
233. Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Interact.* 2008 Sep 25;175(1-3):115-8.
234. WHITTAKER M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anesthesia.* 1980;v.35:p. 174-97.
235. Benyamin B, Middelberg RP, Lind PA, Valle AM, Gordon S, Nyholt DR, et al. GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. *Hum Mol Genet.* 2011 Nov 15;20(22):4504-14.
236. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, et al. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science.* 2006 Dec 22;314(5807):1930-3.
237. Rebbeck TR, Ambrosone CB, Bell DA, Chanock SJ, Hayes RB, Kadlubar FF, et al. SNPs, haplotypes, and cancer: applications in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 May;13(5):681-7.
238. Palmer LJ, Cardon LR. Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet.* 2005 Oct 1;366(9492):1223-34.

ANEXO

**ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Estudo
Genético**

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 produzimos. Todos os resultados obtidos no estudo, após análise do conjunto completo dos dados, serão publicados 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 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Estudo
Funcional**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Susceptibilidade ao Vitiligo – Análise de Correlação Genótipo/Fenótipo do gene *BCHE*

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) estará hospedando um estudo que procurará estabelecer uma relação entre a genética e a bioquímica de uma enzima em pessoas que já participaram de estudo genético anterior. 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). Da amostra de sangue coletada será separado o plasma, que é a parte líquida do sangue, o qual será usado para dosagem enzimática. 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 de sangue), parte nos laboratórios da PUCPR e, se necessário, 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, se necessário, outras instituições.

3) Permissão para estocagem

Está sendo solicitada a sua permissão para estocagem da sua amostra de plasma na PUCPR. Se assinar esse termo de consentimento, você está autorizando estocagem de longo prazo de sua amostra de plasma. Sua amostra de plasma 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 pelos médicos envolvidos no projeto. 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 a algum familiar ou contato afetado com 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) Remuneração

Você não será remunerado por participar deste estudo.

10) Exclusividade do uso do material biológico

Amostras de plasma 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. Resultados finais dos experimentos serão divulgados para você e ao público geral através de publicações em revistas científicas. Como estes dados publicados serão usados por outros investigadores é desconhecido. Importante reafirmar, o alvo de nossos estudos é estabelecer uma correlação entre a genética e a atividade de um componente (enzima) presente no sangue das pessoas, discutindo o possível papel desta correlação no controle da ocorrência do vitiligo. A qualquer momento, você poderá procurar informações sobre o desenvolvimento do projeto com o pesquisador responsável (número de telefone e e-mail estão disponíveis nesse Termo).

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 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 - Análise de Correlação Genótipo/Fenótipo do gene *BCHE*

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para mantê-lo consigo. Todas as páginas desse termo devem ser rubricadas tanto por você como pelo pesquisador. 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) 3271-2030
Celular: (41) 9631-8997
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 3 - Aprovação do Estudo pelo CEP



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**.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "S. Siqueira", is written over a horizontal line.

Prof. Sergio Surugi de Siqueira, Ph.D.

Coordinator

Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná



ANEXO 4 - Questionário para Coleta de Sangue para dosagem da
datividade da enzima BChE

Código do Paciente: _____

Sexo: _____

Peso: _____

Altura: _____

IMC: _____

QUESTIONÁRIO DE APOIO PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE PLASMÁTICA DA ENZIMA BChE

Fatores que influenciam no **acréscimo** da atividade da enzima BChE:

Obesidade _____

Coolesterol e Triglicérides aumentados _____

Hipertensão _____

Alcoolismo _____

Doença Mental (Esquizofrenia) _____

Doença Inflamatória da pele (Psorase) _____

Doença dos Rins. Qual? _____

Hipertireoidismo _____

Fatores que influenciam no **decréscimo** da atividade da enzima BChE:

Último trimestre de gravidez _____

Pílula anticoncepciva _____

Febre > 41°C _____

Tuberculose _____

Infarto do miocárdio _____

Infecção aguda _____

Choque cirúrgico _____

Hipotireoidismo _____

Anemia crônica _____

Má nutrição _____

Câncer _____

Terapia por raios X _____

Drogas anticâncer _____

Agrotóxicos _____

Doenças hepáticas (hepatite aguda, crônica, Cirrose, metástases hepáticas) _____

Doenças do colágeno (distrofia muscular) _____

Observação:

ANEXO 5 - Artigo: "*Genetic Variants of the DDR1 Gene Are Associated with Vitiligo in Two Independent Brazilian Population Samples*"

Genetic Variants of the *DDR1* Gene Are Associated with Vitiligo in Two Independent Brazilian Population Samples

Caio Cesar Silva de Castro^{1,3}, Liliane Machado do Nascimento³, Gaby Walker², Renata Iani Werneck³, Everson Nogoceke² and Marcelo Távora Mira³

Vitiligo is a chronic disease characterized by macules devoid of melanin and identifiable melanocytes. Adhesion of melanocytes to the basement membrane by integrin CCN3 is mediated through collagen IV receptor *DDR1*. We hypothesize that genetic variants of the *DDR1* gene are associated with the occurrence of vitiligo. To test this hypothesis, we genotyped 10 *DDR1* tag single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 212 trios composed of an affected child and both parents. Associated markers were then genotyped in 134 independent, unrelated individuals with vitiligo and 134 unrelated controls. Allele T of tag SNP rs4618569 was associated with an increased risk for vitiligo in the family trios ($P=0.002$, odds ratio (OR) = 5.27; 95% confidence interval (CI) = 1.59–17.40), whereas allele C of tag SNP rs2267641 was associated with an increased risk for vitiligo in both family-based and case-control populations ($P=0.01$, OR = 3.47; 95% CI = 1.22–9.17; $P=0.04$, OR = 6.00; 95% CI = 1.73–52.33, respectively). The best evidence for association in the trios was obtained for a haplotype composed of risk alleles of markers rs4618569 and rs2267641 ($P=0.0006$). There was an age-dependent enrichment of rs4618569 T allele and rs2267641 C allele in early-onset affected individuals. In conclusion, we propose *DDR1* as a susceptibility gene for vitiligo, possibly implicating a defective cell adhesion in vitiligo pathogenesis.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 25 February 2010; doi:10.1038/jid.2010.34

INTRODUCTION

Vitiligo is an acquired systemic, chronic disease with unpredictable clinical evolution, classically characterized by macules devoid of melanin pigment and identifiable melanocytes (Le Poole *et al.*, 1993). More recently, it was shown that melanocytes are not completely absent on the depigmented epidermis (Tobin *et al.*, 2000). Vitiligo can be classified into segmental or non-segmental, with different ethiopathological origins being proposed for these two clinical forms of disease (Hann and Lee, 1996). Non-segmental vitiligo includes the focal and generalized subgroups, the latter being further subdivided into vulgar, acrofacial, and universal (Huggins *et al.*, 2005).

The observation that healthy skin from individuals affected by non-segmental vitiligo showed melanocyte detachment after experimentally controlled skin friction (Gauthier *et al.*, 2003a) led to a theory in which vitiligo is a primary melanocytorrhagic disorder with altered melanocyte responses to skin trauma, inducing melanocyte detachment and subsequent transepidermal loss. The authors speculate that an autoimmune phenomenon might have been triggered during melanocyte injury, caused by antigen release and recognition by dendritic cells or memory T cells, aggravating melanocyte detachment and loss (Gauthier *et al.*, 2003b).

Discoidin domain receptor 1 (*DDR1*) is a transmembrane tyrosine kinase receptor activated by several collagens (Vogel, 1999) that functions independently of $\beta 1$ integrins (Shrivastava *et al.*, 1997). Collagen activation of *DDR1* has impact over several functions of human leukocytes, such as cell differentiation, adhesion, and cytokine production (Yoshimura *et al.*, 2005). It is noted that *DDR1* mediates E-cadherin (Wang *et al.*, 2009) and matricellular integrin CCN3-dependent cell adhesion to collagen type IV (Fukunaga-Kalabis *et al.*, 2006). Functional assays show inhibition of *DDR1* by imatinib mesylate (Gleevec) (Day *et al.*, 2008), a potent inhibitor of BCR–ABL tyrosine kinase and c-Kit tyrosine kinase (Buchdunger *et al.*, 2000). Interestingly, the use of imatinib can lead to vitiligo-like lesions (Tsao *et al.*, 2003; Legros *et al.*, 2005; Brazzelli *et al.*, 2006), possibly due

¹Department of Dermatology, Santa Casa de Misericórdia Hospital, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil; ²F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland and ³Group for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Correspondence: Marcelo Távora Mira, Group for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, CEP 80 215-901, Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail: m.mira@pucpr.br

Abbreviations: *DDR1*, discoidin domain receptor 1; *KP*, Köebner phenomenon; *LD*, linkage disequilibrium; *SNP*, single-nucleotide polymorphism

Received 1 December 2009; revised 8 January 2010; accepted 12 January 2010

to inhibition of tyrosinase activity through the c-kit pathway blockade (Cario-Andre *et al.*, 2006). The *DDR1* gene is located between *HLA-E* and *HLA-C* genes at chromosomal region 6p21 previously linked to vitiligo susceptibility in a Chinese population (Liang *et al.*, 2007).

Molecular genetic epidemiology tools have been used in linkage and association studies aiming to locate and identify the genes and the variants involved with vitiligo phenotypes. Here, we present data of a combined family-based and case-control association analysis between vitiligo and genetic variants of the gene *DDR1* involved in the regulation of melanocyte attachment to the base membrane of the epidermis. We selected 10 tag single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that completely captured the information of the *DDR1* locus. These markers were genotyped in 596 individuals distributed in 212 family trios composed of one affected individual and both parents, ideal for genetic association analysis. Positive signals of association were then tested in an independent case-control population sample of 134 vitiligo-affected individuals and 134 unrelated controls, both groups recruited from the same geographic area in the south of Brazil as the family trios.

RESULTS

Our recruitment strategy led to the enrollment of 596 (225 affected) individuals distributed in 188 nuclear pedigrees from which 212 family trios could be derived. In addition to the family trios, we also enrolled a case-control population sample composed of 134 vitiligo patients and 134 control individuals fully matched by age, gender, and ethnicity. Table 1 summarizes and compares the characteristics of the affected individuals of the two studied populations. The median age of onset of the probands from the family-based sample was 18.7 ± 12.1 years, in contrast with 26.35 ± 17.01 in the case group of the case-control sample (*P* = 0.0001). A higher proportion of family history of vitiligo was observed in the family-based group, compared with the population-based sample (*P* = 0.001). Borderline difference in the distribution of the clinical form of disease, classified as segmental and non-segmental, was observed across the two samples (*P* = 0.04). There were no significant differences between the two population samples for distribution of gender and presence of autoimmune comorbidity. The most frequent autoimmune comorbidities observed in the family trios were autoimmune thyroid disease (15.3%), halo nevi (7.9%), and psoriasis (1.6%); among the cases of the case-control sample, the proportions were 15.6, 3, and 4.5%, respectively. Of the 212 probands of the family-based sample, 81.69% self-reported European ancestry and 15.96% reported a mixed Caucasian, African, and Native American background. African or Japanese ancestry was self-reported by two individuals each, and one individual reported an Iranian ethnic background. Affected individuals from the case-control population sample self-reported European (79.10%), mixed (19.40%), and African (1.50%) ancestry. The genotyping success rate was 95% or higher for all markers tested. Allele frequencies for all markers were in Hardy-Weinberg equilibrium in both population samples included in the study.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of cases from both studied population samples

	Family-based n=225	Case-control n=134	P-value
<i>Age of vitiligo onset (years)</i>			
Mean (±SD)	18.7 ± 12.1	26.35 ± 17.01	0.0001 ¹
<i>Gender, n (%)²</i>			
Male	97 (43.1)	55 (41)	0.701 ³
Female	128 (56.9)	79 (59)	
<i>Autoimmune-comorbidity, n (%)²</i>			
With	105 (46.7)	54 (40.3)	0.29 ³
Without	106 (47.1)	69 (51.5)	
<i>Type, n (%)²</i>			
Segmental	35 (15.5)	13 (9.7)	0.04 ³
Non-segmental	177 (78.7)	121 (90.3)	
<i>Family history of vitiligo, n (%)²</i>			
With	92 (40.9)	37 (27.6)	0.001 ³
Without	115 (51.1)	89 (66.4)	

¹ *t*-test.

² *n* = number of individuals with available information.

³ χ^2 statistic.

Family-based association analysis

Family-based association analysis performed for all 10 SNPs detected significant association between vitiligo and six markers of the *DDR1* locus that included the close neighboring gene *GTF2H4* (rs4618569, *P* = 0.002; rs1049622, *P* = 0.01; rs1049623, *P* = 0.05; rs226741, *P* = 0.01; rs1049628, *P* = 0.01 and rs2074510, *P* = 0.04). Out of these six associated SNPs, four were in strong linkage disequilibrium (LD) in our population sample and two (rs1049623 and rs2267641) were singletons. Odds ratio, as estimated by conditional logistic regression analysis, reached 5.27 for the marker rs4618569 (IC = 1.59–17.40) (Table 2). Haplotypic analysis involving the three independent tag SNPs associated with vitiligo in the family trios revealed strong evidence for association between vitiligo and haplotypes composed of risk alleles of markers rs4618569 and rs2267641 (*P* = 0.0006), rs1049623 and rs2267641 (*P* = 0.008), and all three tag SNPs (*P* = 0.004) (Table 3).

To further advance the understanding of the association effect observed, we performed a stratified analysis according to the non-genetic covariate age of diagnosis, presence of autoimmune comorbidity, and presence of family history of disease. Association signals for markers rs4618569 and rs2267641 were clearly concentrated among the trios with early age of onset of the affected child (Table 4), using both a cutoff of 18 and 25 years of age. For the other two covariates,

Table 2. Association between vitiligo and SNP markers of the *DDR1* locus in two independent population samples

Marker name	<i>DDR1</i> rs4618569	<i>DDR1</i> rs1049622	<i>DDR1</i> rs1049623	<i>DDR1</i> rs2267641	<i>DDR1</i> rs1049628	<i>GTF2H4</i> rs2074510
<i>Family-based analysis</i>						
Bin structure ¹						
AF	0.77	0.77	0.62	0.77	0.77	0.78
Risk allele	T	C	T	C	G	G
FBAT (<i>P</i> -value)	0.002	0.01	0.05	0.01	0.01	0.04
OR (95% CI)	5.27 (1.59–17.40)	3.36 (1.15–9.75)	1.73 (0.97–3.08)	3.47 (1.22–9.17)	3.40 (1.17–9.80)	2.91 (0.99–8.48)
<i>Case-control</i>						
Risk allele	—	—	—	C	—	—
<i>Univariate</i>						
OR (95% CI)	NS	—	NS	6.00 (1.73–52.33) ²	—	—
<i>P</i> -value				0.04		

Abbreviations: AF, allele frequency; CI, confidence interval; NS, not significant; *P*, reported for the best fit model; SNP, single-nucleotide polymorphism.
¹A bin is composed of markers in strong linkage disequilibrium ($r^2 > 0.8$); any SNP in the bin is sufficient to explain the observed association with vitiligo.
²Case-control sample of 134 cases (genotype frequency CC/CT-99.2%) and 134 controls (genotype frequency CC/CT-95.1%).

Table 3. Family-based association analysis between vitiligo and two- and three-marker haplotypes

Haplotype			Haplotype frequency	Number of informative families	Z	<i>P</i> (FBAT)
rs4618569	rs1049623	rs2267641				
T	—	C	0.72	35.9	3.4	0.0006
C	—	T	0.18	71.8	-0.3	0.74
T	—	T	0.05	20.2	4.5	0.54
T	T	—	0.61	59.6	2.2	0.02
C	T	—	0.22	74.3	-0.3	0.69
T	C	—	0.16	76.1	0.3	0.71
—	T	C	0.58	71.6	2.6	0.008
—	C	T	0.20	76.2	0.8	0.40
—	C	C	0.18	87.1	-1.5	0.13
T	T	C	0.58	63.7	2.8	0.004
C	C	T	0.18	66.5	15.8	0.47
T	C	C	0.14	67.9	-0.3	0.74

Only haplotypes with allelic frequency ≥ 0.05 were included and analyzed.

evidence for association did not resist stratification into each subgroup.

Case-control association analysis

To validate the association results described above, *DDR1* markers rs4618569, rs2267641, and rs1049623 associated with vitiligo in the family trios were genotyped and tested for association in an independent case-control population sample recruited from the same geographic area as the family trios. Linkage disequilibrium analyses confirmed independence of all three SNPs in the case-control sample, as observed for the family trios. Univariate analyses indicated statistically significant association between marker

rs2267641 and vitiligo, with the same risk allele being observed for both populations ($P=0.04$, OR=6.00; 95% CI=1.73–52.33) (Table 2; see Supplementary Table S1 online). As the controls were matched with the cases by gender, ethnicity, and age, no multivariate analysis was performed.

DISCUSSION

Genetic risk factors for complex traits have been intensively investigated over the past decade and candidate genes have been proposed for several common diseases, including vitiligo. Here, we present strong evidence for age-dependent association between vitiligo and variants of the *DDR1* gene in a large population sample of family trios from the south of

Table 4. Age-dependent genetic risk for vitiligo in the family trios

SNP ID	Risk allele	Age of onset (years)	P-value ¹	Odds ratio (95% CI)
rs4618569	T	≤18	0.007	1.88 (1.18–3.01)
		>18	0.63	1.38 (0.36–5.30)
		≤25	0.009	6.87 (1.6–29.18)
		>25	0.50	2.12 (0.23–18.83)
rs2267641	C	≤18	0.03	1.64 (1.02–2.62)
		>18	0.10	1.85 (0.88–3.89)
		≤25	0.03	3.76 (1.1–12.62)
		>25	0.35	2.66 (0.33–21.31)

Number of trios: 110 For ages ≤18 and 89 for >18 years old; 143 for ages ≤25 and 56 for >25 years old; 13 individuals, data not available.

¹P reported for the best fit model.

Brazil. Family-based association and LD analysis of the *DDR1* locus revealed three independent association signals corresponding to three tag SNPs, all intragenic to *DDR1*. When two- and three-marker haplotypes were constructed using the associated tag SNPs, association became more evident.

Interestingly, the association signal observed for two of the three independent disease markers was strongly dependent of age, using as a cutoff both the average age of diagnosis in our trios (18 years old) and the average age of diagnosis reported in the literature (Alkhateeb *et al.*, 2003) (25 years old, compatible with the average age of diagnosis in our case-control population sample). A similar age-dependent effect was recently observed for the *LTA* gene associated with leprosy in population samples of distinct ethnic backgrounds (Alcais *et al.*, 2007) and is in agreement with the hypothesis of a higher impact of genetic variants over populations with early onset complex diseases. It is noted that a recent, large association study on a Chinese population also revealed an influence of age over association between vitiligo and the promoter variant rs226977 of the gene *XBPI*, with borderline significance (Ren *et al.*, 2009).

No impact of the co-occurrence of autoimmune disorders was observed over *DDR1* association with vitiligo in our sample. Again, the same was observed in the *XBPI* study (Ren *et al.*, 2009), suggesting the existence of at least two groups of vitiligo susceptibility genes, as previously indicated by genome-wide linkage results (Spritz *et al.*, 2004): those acting over an autoimmune background, such as *NALP1* (Jin *et al.*, 2007), and others controlling additional, independent physiopathological mechanisms, such as *DDR1* and *XBPI*. Finally, both *DDR1* and *XBPI* (Ren *et al.*, 2009) associations are independent of the presence of family history of disease.

Genetic association studies involving a large number of tests are always prone to spurious positive findings because of multiple testing. To confirm association, all three *DDR1* tag SNPs associated with vitiligo in the family-based population were tested on an independent case-control sample, with

positive evidence for association again being obtained for marker rs2267641 ($P=0.04$). It is possible that lack of association between the other two tag SNPs and vitiligo in the case-control sample is due to the age effect observed in the family trios—mean age of diagnosis of the cases of the case-control population was higher than 25 years, perhaps indicating a weaker genetic component controlling susceptibility to the disease as compared with the family-based sample. Nevertheless, perfect replication of the association signal for marker rs2267241, with the same risk allele on both population samples, argues strongly in favor of *DDR1* as a vitiligo susceptibility gene.

There are limitations in our study that should be addressed: (i) the loss of the association signal when the population sample of trios was stratified by the co-occurrence of autoimmune diseases and family history of vitiligo may be simply a consequence of loss of power due to a decrease in the sample size; (ii) the non-segmental clinical form of vitiligo is over-represented in both our samples—therefore, it is possible that *DDR1* is a gene associated exclusively with this particular form of disease. In fact, when segmental cases are removed from the family-based analysis, association persists for two out of three tag SNPs (rs4618569, $P=0.03$ and rs2267641, $P=0.02$) even with the reduction in the number of informative families; (iii) the small sample size of the case-control population certainly limits the power of the replication experiment. These first three limitations can be addressed by expanding the population samples. Finally, the MHC/HLA locus is classically known as presenting a very complex LD structure (Stenzel *et al.*, 2004) and it is possible that the *DDR1* alleles associated with vitiligo are in LD with the true causative variant located elsewhere within the region. Several HLA alleles have been associated with susceptibility to vitiligo in different populations (Zhang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005; Abanmi *et al.*, 2006). Further studies should address whether the association detected for *DDR1* markers is independent from other gene variants associated with vitiligo already described for this locus.

There is no obvious functional impact of the *DDR1* tag SNPs associated with vitiligo in this study. In addition, none of the known non-synonymous *DDR1* SNPs belong to any of the three associated bins described here. However, SNPs rs2267641 and rs1049623 are exonic, synonymous variants. Mechanisms by which synonymous SNPs could affect the protein function include impact over mRNA secondary structure with consequences on the level of protein expression (Nackley *et al.*, 2006). Furthermore, it has been recently shown that silent polymorphisms may deeply alter protein function—the authors propose a mechanism of modification of timing of co-translational folding and protein localization in specific cell compartments (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). How the associated variants of *DDR1* affect gene and, consequently, cell function remains to be investigated. One powerful strategy would be systematic comparative sequencing of the entire coding region of *DDR1* that will eventually lead to the identification of the true vitiligo causative variants. Further functional experiments involving tools such as gene expression and RNA stability analysis, gene silencing, and

immunohistochemistry would then be mandatory to establish the molecular defect responsible for the occurrence of the disease.

There is no consensus regarding exactly how melanocytes succumb to vitiligo (Schallreuter *et al.*, 2008). Here, we present *DDR1* as a susceptibility gene for vitiligo, highlighting a possible defective adhesion role in vitiligo pathogenesis: on the basis of our findings, one can speculate that vitiligo patients harboring *DDR1* variants have altered melanocyte adhesion to the basement membrane, particularly at trauma sites, contributing to local melanocyte disappearance.

MATERIALS AND METHODS

Population sample

This study was performed between December 2004 and November 2008. Affected individuals, their parents, and independent controls were enrolled from the Brazilian southern states of Paraná and Santa Catarina. Control individuals, matched with the cases by age, gender, and ethnicity were recruited from primary care centers located in the same geographical areas of the cases. Eligibility criteria for the control group were no self-reported history of autoimmune and inflammatory disease and no sign of vitiligo on complete physical examination by an experienced dermatologist. All patients and their relatives were ascertained at the outpatient vitiligo clinic of the Santa Casa de Misericórdia Hospital and a private medical office. On agreement to participate, the patient was asked to reach their parents and siblings to inform about the study and suggest voluntary contact with the investigators for possible enrollment and data collection.

All patients and relatives had their vitiligo status defined or confirmed by one single dermatologist (CCSC), who also performed disease classification of the confirmed cases. Diagnosis was performed on the basis of clinical findings after complete physical examination and Wood's lamp screening, and most of the individuals included were followed up during the period of the study. When necessary, confirmation of affected status was obtained on biopsy and histopathological examination.

Confirmed cases of vitiligo were classified as segmental and non-segmental disease, the latter including the focal, acrofacial, vulgar, and universal clinical forms. Patients were characterized as affected by segmental vitiligo if presenting unilateral or bilateral macules in a dermatomal or quasi-dermatomal distribution in one or more dermatomes. Focal vitiligo was characterized by one or more macules confined in a single specific area of the skin in a non-dermatomal distribution. Acrofacial vitiligo was characterized by macules in distal digits, and as periorificial on face and ano-genital areas. Minimal duration of acrofacial and focal vitiligo disease considering "stable vitiligo" was 1 year (Taieb and Picardo, 2007). Patients presenting lesions beyond acrofacial areas, such as the thorax, abdomen, thighs, legs, buttocks, arms, neck, and axillae, were classified as affected by vulgar vitiligo. Individuals affected by universal vitiligo presented few remaining normal macules of pigmentation on extended skin exam.

After diagnosis, all individuals with confirmed cases answered a questionnaire to determine gender, age of onset (self-reported as the date when the first white spot was observed), presence of family history of vitiligo as reported by the affected individual or a close

relative, and occurrence of autoimmune diseases in the nuclear family, for example, among parents or siblings of the vitiligo-affected individual. Control individuals were asked about gender, age, and inflammatory and autoimmune diseases. All enrolled individuals had a blood sample collected and used for genomic DNA extraction following classic salting-out protocol (John *et al.*, 1991).

The study was approved by the Pontifical Catholic University of Paraná Ethics Committee and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. Written, informed patient consent was obtained for all individuals enrolled.

Marker selection and genotyping

Tag SNP markers capturing the entire information of the *DDR1* locus were selected according to the information available at the International HapMap Project website, release 21. All selected markers presented a minor allele frequency of 0.2 or more in at least four populations: Caucasian, Japanese, Yoruba, and Chinese Han. The cutoff parameter to define LD between two markers was an $r^2 > 0.8$. Following these criteria, the following tag SNPs were included: rs4618569, rs1264323, rs1264320, rs2267641, rs1049622, rs1049623, rs1049628, rs1264319, rs2074510, and rs1264307, the last two markers spanning into the neighboring gene *GTF2H4*. SNPs were genotyped in one or both of the following platforms: (i) Applied Biosystems StepOnePlus or Applied Biosystems 7500 polarized fluorescence TaqMan assay (Lee *et al.*, 1993); (ii) SEQUENOM MassARRAY, which uses the iPLEX assay to incorporate mass-modified terminal nucleotides in the SBE step that are then detected by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Griffin and Smith, 2000). Genotypes were automatically called using the appropriate software with subsequent manual checking of accuracy. Five SNPs (rs4618569, rs12644323, rs1049622, rs1264320, and rs2267641) were genotyped in duplicate in the family-based sample.

Statistical methods

Demographic and clinical variables of the cases from both the family-based and the case-control population samples were compared using χ^2 and the *t*-test, when indicated.

On genotyping, families presenting Mendelian inconsistencies were removed from the analysis. Hardy-Weinberg equilibrium and LD estimations were carried out using Haploview software (Barrett *et al.*, 2005). SNP bins were constructed using pairwise r^2 estimates obtained from parental data from the family trios and the control group of the case-control sample, and were defined as a not necessarily contiguous set of variants, in which at least one SNP has $r^2 > 0.8$ with all the other SNPs of the bin (Hinds *et al.*, 2005).

As the family-based sample consisted of trios with no missing parental information, a classic transmission disequilibrium test was performed for family-based association analysis, as implemented by FBAT software V. 2.0.2.c (Horvath *et al.*, 2001). FBAT was also used for family-based haplotypic association analysis, and *P*-values were adjusted using the Monte Carlo haplotype test using the *hbat* procedure. For estimation of OR, alleles for which positive evidence for association was detected were analyzed by conditional logistic regression analysis (Schaid and Rowland, 1998) using the PHREG procedure, as implemented in SAS software v.9.1. The population-based study was carried out using classical univariate techniques as implemented in SAS software v.9.1.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all affected individuals, their families, and healthy volunteers for agreeing to participate in the study. We thank Dr Beno Paciornick, Head Director of Hormocentro Clinical Laboratory, for sample collection support. We also thank the Molecular Medicine Laboratories of Hoffmann La-Roche Ltd. (Basel, Switzerland): Klaus Lindpaintner, Hanno Langen, Angélique Augustin, Olívia Spleiss, and Thomas Schindler for valuable support. A special acknowledgment is addressed to Dr Erwin Schurr, Dr Alexandre Alcaís, and Dr Aurelie Cobat for valuable suggestions during the development of the study and preparation of the article. R. I. Werneck was supported by CAPES/PDEE and CAPES/PROSUP scholarships. L. M. Nascimento was supported by a “Marcelino Champagnat Award” scholarship. This work received financial support from the Research Office of the Pontifical Catholic University of Paraná. G Walker and E Nogoceke are Hoffmann La-Roche Ltd employees. C. C. S. de Castro received a scholarship from the Roche Fellowship Program—Genomic Technologies Applied to the Investigation of Innovative Therapeutics.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

REFERENCES

- Abanmi A, Al Harthi F, Al Baqami R *et al.* (2006) Association of HLA loci alleles and antigens in Saudi patients with vitiligo. *Arch Dermatol Res* 298:347–52
- Alcais A, Alter A, Antoni G *et al.* (2007) Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin- α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 39:517–22
- Alkhateeb A, Fain PR, Thody A *et al.* (2003) Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res* 16:208–14
- Barrett JC, Fry B, Maller J *et al.* (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–5
- Brazzelli V, Roveda E, Prestinari F *et al.* (2006) Vitiligo-like lesions and diffuse lightening of the skin in a pediatric patient treated with imatinib mesylate: a noninvasive colorimetric assessment. *Pediatr Dermatol* 23:175–8
- Buchdunger E, Cioffi CL, Law N *et al.* (2000) Abl protein-tyrosine kinase inhibitor ST1571 inhibits *in vitro* signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295:139–45
- Cario-Andre M, Ardilouze L, Pain C *et al.* (2006) Imatinib mesilate inhibits melanogenesis *in vitro*. *Br J Dermatol* 155:493–4
- Day E, Waters B, Spiegel K *et al.* (2008) Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol* 599:44–53
- Fukunaga-Kalabis M, Martinez G, Liu ZJ *et al.* (2006) CCN3 controls 3D spatial localization of melanocytes in the human skin through DDR1. *J Cell Biol* 175:563–9
- Gauthier Y, Cario-Andre M, Lepreux S *et al.* (2003a) Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *Br J Dermatol* 148:95–101
- Gauthier Y, Cario Andre M, Taieb A (2003b) A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Res* 16:322–32
- Griffin TJ, Smith LM (2000) Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol* 18:77–84
- Hann SK, Lee HJ (1996) Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. *J Am Acad Dermatol* 35:671–4
- Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB *et al.* (2005) Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* 307:1072–9
- Horvath S, Xu X, Laird NM (2001) The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet* 9:301–6
- Huggins RH, Schwartz RA, Janniger CK (2005) Vitiligo. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 14:137–42, 44–5
- Jin Y, Mailloux CM, Gowan K *et al.* (2007) NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med* 356:1216–25
- John SW, Weitzner G, Rozen R *et al.* (1991) A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res* 19:408
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW *et al.* (2007) A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315:525–8
- Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Westerhof W *et al.* (1993) Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. *J Invest Dermatol* 100:816–22
- Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21:3761–6
- Legros L, Cassuto JP, Ortonne JP (2005) Imatinib mesilate (Glivec): a systemic depigmenting agent for extensive vitiligo? *Br J Dermatol* 153:691–2
- Liang Y, Yang S, Zhou Y *et al.* (2007) Evidence for two susceptibility loci on chromosomes 22q12 and 6p21-p22 in Chinese generalized vitiligo families. *J Invest Dermatol* 127:2552–7
- Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE *et al.* (2006) Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 314:1930–3
- Ren Y, Yang S, Xu S *et al.* (2009) Genetic variation of promoter sequence modulates XBP1 expression and genetic risk for vitiligo. *PLoS Genet* 5:e1000523
- Schaid DJ, Rowland C (1998) Use of parents, sibs, and unrelated controls for detection of associations between genetic markers and disease. *Am J Hum Genet* 63:1492–506
- Schallreuter KU, Bahadoran P, Picardo M *et al.* (2008) Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? *Exp Dermatol* 17:139–40; discussion 41–60
- Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E *et al.* (1997) An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1:25–34
- Spritz RA, Gowan K, Bennett DC *et al.* (2004) Novel vitiligo susceptibility loci on chromosomes 7 (AIS2) and 8 (AIS3), confirmation of SLEV1 on chromosome 17, and their roles in an autoimmune diathesis. *Am J Hum Genet* 74:188–91
- Stenzel A, Lu T, Koch WA *et al.* (2004) Patterns of linkage disequilibrium in the MHC region on human chromosome 6p. *Hum Genet* 114:377–85
- Taieb A, Picardo M (2007) The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res* 20:27–35
- Tobin DJ, Swanson NN, Pittelkow MR *et al.* (2000) Melanocytes are not absent in lesional skin of long duration vitiligo. *J Pathol* 191:407–16
- Tsao AS, Kantarjian H, Cortes J *et al.* (2003) Imatinib mesylate causes hypopigmentation in the skin. *Cancer* 98:2483–7
- Vogel W (1999) Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* 13(Suppl):S77–82
- Wang CZ, Yeh YC, Tang MJ (2009) DDR1/E-cadherin complex regulates the activation of DDR1 and cell spreading. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C419–29
- Yang S, Wang JY, Gao M *et al.* (2005) Association of HLA-DQA1 and DQB1 genes with vitiligo in Chinese Hans. *Int J Dermatol* 44:1022–7
- Yoshimura T, Matsuyama W, Kamohara H (2005) Discoidin domain receptor 1: a new class of receptor regulating leukocyte-collagen interaction. *Immunol Res* 31:219–30
- Zhang XJ, Liu HS, Liang YH *et al.* (2004) Association of HLA class I alleles with vitiligo in Chinese Hans. *J Dermatol Sci* 35:165–8

ANEXO 6 - Artigo: "*A pattern of association between clinical form of vitiligo and disease-related variables in a Brazilian population*"



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Dermatological Science

journal homepage: www.elsevier.com/jds



A pattern of association between clinical form of vitiligo and disease-related variables in a Brazilian population

Caio Cesar Silva de Castro^{a,b}, Liliane Machado do Nascimento^b, Márcia Olandoski^b,
Marcelo Távora Mira^{b,*}

^a Department of Dermatology, Santa Casa de Misericórdia Hospital, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

^b Group for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, CEP 80 215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2011

Received in revised form 26 July 2011

Accepted 25 September 2011

Keywords:

Vitiligo

Association

Clinical form

Koebner phenomenon

Epidemiology

ABSTRACT

Background: Vitiligo classification systems are often based exclusively on the number and distribution of the white patches. To what extent these classification protocols reflect possible different pathophysiological basis for vitiligo or carry any prognostic value is currently unknown.

Objective: To investigate patterns of association between type of vitiligo and common disease-related variables, in order to advance on the understanding of the exact nature of different clinical forms of disease, as well as to identify features with prognostic value for clinical progression of early diagnosed vitiligo.

Materials and methods: This is a cross-sectional study of a population sample from south of Brazil composed of 586 independent vitiligo-affected individuals. Different strategies of case-control analysis were employed to test for association between the three most common vitiligo clinical types and age of onset, family history of vitiligo, occurrence of Koebner phenomenon (KP) and presence of autoimmune co-morbidity.

Results: Individuals affected by segmental vitiligo showed lower average age of onset (16 years) when compared with vulgaris (23.9 years) and acrofacial cases (29 years) ($p < 0.001$). The distribution of occurrence of KP, family history of vitiligo and co-occurrence of autoimmune disease followed a gradient pattern, with high, intermediate and low chance of occurrence of all three variables observed for vulgaris, acrofacial and segmental vitiligo, respectively ($p < 0.001$ for overall distribution).

Conclusion: Results indicate a uniform pattern of association between vitiligo clinical forms and KP, positive vitiligo family history and occurrence of co-morbidity autoimmune. The impact of the observed pattern of association over disease prognosis and classification is discussed.

© 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd on behalf of Japanese Society for Investigative Dermatology.

1. Introduction

Vitiligo is an acquired chronic disease characterized by macules in which melanocytes are absent [1] or not functional [2]. Prevalence of the disease ranged from 0.4% [3] to 1.8% [4] in different population samples from distinct ethnic backgrounds. Mean and median age of vitiligo onset in the general population was estimated in 24.2 (standard deviation (SD) = 15.4) and 37 years old, respectively, in a sample of independent Caucasian affected subjects [5].

Clinical manifestation of vitiligo varies dramatically across affected individuals, suggesting the existence of different clinical forms of disease [6]. Most of the initiatives to create a classification

system for vitiligo have been based exclusively on the number and distribution of the white patches [7]. For example, the widely used protocol proposed by the Vitiligo European Task Force uses number and location of lesions to distribute the disease as generalized or localized; generalized vitiligo may be further subdivided into acrofacial, vulgaris and universalis, and localized vitiligo, into segmental and focal [8]. A more simplified criteria divides vitiligo into segmental and non-segmental, according to the occurrence or not of a dermatomal distribution of the lesions [9].

Etiopathogenesis of vitiligo is still not clear and several theories has been proposed, involving neural [10], biochemical [11] and autoimmune mechanisms [12], as well as events such as melanocyte detachment [13] and death by apoptosis [14]. Among these, perhaps the most well accepted is the autoimmune theory, supported by findings such as the frequent occurrence of other autoimmune diseases in vitiligo patients and their relatives [15] as

* Corresponding author. Tel.: +55 4132712030.
E-mail address: m.mira@pucpr.br (M.T. Mira).

well as the presence of auto-antibodies and auto-reactive T cells in vitiligo patients, both with cytotoxic effects upon melanocytes [16]. Interestingly, co-occurrence with autoimmune diseases seems to be dependent of the clinical type of vitiligo: a large number of autoimmune diseases has been associated with non-segmental vitiligo [15]; however, the observation is not as frequent when considering exclusively the segmental clinical type of disease [17].

Several other clinical features also seem to distribute differently according to clinical type of vitiligo. Early onset has been associated with segmental disease in China, Korea and Caucasians, whereas vulgaris vitiligo tends to manifest later in life [17–20]. In addition, generalized vitiligo onset seems to be earlier in probands from multiplex families (mean = 21.5 (SD = 15.0) and median = 18.5 years old) [18,21], an observation compatible with the hypothesis of a higher impact of genetic variants over populations with early onset complex diseases [22]. In Korean segmental patients, 11.5% presented family history of vitiligo [17], whereas in Caucasians affected by generalized disease, this frequency reached 27.4% [15]. For acrofacial disease, 69% of the cases showed positive vitiligo family history; the same study found 80% of occurrence of the same variable for vitiligo vulgaris [23].

Köebner phenomenon (KP) is defined as the development of achromic macules at skin sites subjected to trauma such as cuts, burns, insect bites or abrasion [24]. Occurrence of KP in vitiligo has been described with frequencies ranging from 14.8% [25] to 21% [26], 36.5% [15] and even 57.9% [27] of the patients. Frequency of occurrence of KP according to vitiligo clinical form was 31% for vulgaris [28] and 5.3% for segmental [17] disease; there is no available data linking KP with acrofacial vitiligo.

Here we present strong evidence for association between the three major types of vitiligo (segmental, acrofacial and vulgaris) and age of onset, occurrence of KP, autoimmune co-morbidity and family history of disease. A combined, comprehensive analysis of our results is proposed and may be useful to improve vitiligo classification protocols, with possible impact over disease prognosis.

2. Materials and methods

2.1. Studied population

This study was approved by the Ethics Research Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná and was conducted according the principles of the Declaration of Helsinki. The study was performed between December 2004 and September 2007; affected individuals were enrolled in two Brazilian southern states, Paraná and Santa Catarina, predominantly inhabited by populations of Caucasian background. Written informed consent was obtained from all study participants. Upon agreement to participate, the patient was invited to inform their parents and siblings about the study and suggest voluntary contact with the investigators for possible enrolment and data collection.

All patients were ascertained at the outpatient vitiligo clinic of the Santa Casa de Misericórdia Hospital and a private medical office. To maintain consistency of the diagnosis, all patients and relatives had their vitiligo status defined or confirmed by one single, experienced dermatologist (C.C.S.C.), who also performed disease classification of the confirmed cases. Diagnosis was performed based on clinical findings after complete physical examination and Wood's lamp screening, and most of the included individuals were followed-up during the period of the study. Individuals whose diagnoses were not clinically confirmed were submitted to biopsy and histo-pathological examination.

Confirmed cases of vitiligo were classified as focal, acrofacial, vulgaris, universal and segmental [7]. Focal vitiligo was characterized by one or few macules confined in a single specific area of the

skin in a non-dermatomal distribution. Acrofacial vitiligo was characterized by macules in distal digits, periorificial-facial and ano-genital areas. Minimal follow-up to consider an individual affected by acrofacial disease was 1 year. Patients presenting lesions beyond acrofacial areas, such as thorax, abdomen, thighs, legs, buttocks, arms, neck and axillae were classified as affected by vulgaris vitiligo. Individual affected by universal vitiligo presented few remaining normal macules of pigmentation upon extended skin exam. Finally, patients were characterized as affected by segmental vitiligo if presenting unilateral or bilateral macules in a dermatomal or quasi-dermatomal distribution in one or more dermatomes. All patients were investigated for the occurrence of KP. To avoid confounding with acrofacial lesions, typically observed in areas under natural abrasion, occurrence of KP was considered only if the suspected area has been affected by cuts, bites, burns or other trauma.

After diagnosis, all confirmed cases answered a questionnaire to determine gender, age of onset (self-reported as the date when the first white spot was observed), presence of family history of vitiligo, as reported by the affected individual or a close relative, and self-reported occurrence of autoimmune diseases in the nuclear family, that is, parents or siblings (first degree relatives) of the vitiligo affected individual. All patients were submitted to treatment, if required, during and after the period of the study.

2.2. Statistical analysis

Due to the small number of focal and universal cases (five of each), these have been removed from the statistical analysis; therefore, only the three most common clinical types (vulgaris, acrofacial and segmental) were included. The chi-square test was used to investigate association between clinical type of vitiligo and occurrence of KP, autoimmune co-morbidity and family history of disease. To compare the average age of onset of vitiligo across segmental, vulgaris and acrofacial clinical types, one-way analysis of variance was used after applying logarithmic transformation over the variable age. Multivariate analysis was performed using a Multinomial Logistic Regression model that allowed for the estimation of the Odds Ratio (OR) and the 95% Confidence Interval (CI). The decision about significance of the factors was based on the Wald test. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. When Fisher's exact test was used for multiple comparisons, significance level after Bonferroni correction was adjusted to $p < 0.017$. Statistical analysis was performed using *Statistica* v8.0.

3. Results

Our enrollment strategy led to the inclusion of 589 individuals that agreed to participate in the study. Upon exclusion of three patients presenting mixed clinical forms of disease, 586 vitiligo patients (340 females and 246 males) remained, distributed into 349 cases of vulgaris, 151 cases of acrofacial and 86 cases of segmental disease. Average and median age of vitiligo onset was 24 (SD = 15.4) and 22 years old (range 0.5–69), respectively. Details of the overall distribution observed for the clinical parameters included in the study are summarized in Table 1. Table 2 presents a detailed description of the autoimmune co-morbidities, stratified according to clinical type of vitiligo.

3.1. Association analysis

Univariate association analysis revealed significantly different overall distribution of all clinical variables across the three most common types of vitiligo: vulgaris, acrofacial and segmental. Difference in the distribution of autoimmune disease in the nuclear family was statistically significant between segmental and vulgaris

Table 1
Epidemiological description of the affected population sample.

	Male	Female	Na ^a
Gender n (%)=586	246 (42)	340 (58)	-
Vitiligo family history n (%)	Present 179 (30.5)	Absent 354 (60.4)	Na 53 (9.0)
Autoimmune co-morbidity in the nuclear family n (%)	Present 239 (40.8)	Absent 273 (46.6)	Na 74 (12.6)
Autoimmune co-morbidity in the proband n (%)	Present 158 (27.0)	Absent 417 (71.2)	Na 11 (1.9)
Males	74 (30.1)	168 (68.3)	4 (1.6)
Females	84 (24.7)	249 (73.2)	7 (2.1)
Köebner phenomenon n (%)	Present 221 (37.7)	Absent 330 (56.3)	Na 35 (6.0)

^a Non-available.

Table 2
Autoimmune co-morbidities observed in the proband, according to the clinical type of vitiligo.

Autoimmune disease	Clinical type		
	Segmental (n=84), %	Acrofacial (n=149), %	Vulgaris (n=342), %
Autoimmune thyroid disease	4 (4.6)	14 (9.3)	65 (18.5)
Autoimmune thyroid disease + type 1 diabetes mellitus	0	0	1 (0.2)
Autoimmune thyroid disease + halo nevi	0	0	3 (0.8)
Autoimmune thyroid disease + type 1 diabetes mellitus + halo nevi	1 (1.1)	0	1 (0.2)
Type 1 diabetes mellitus	0	2 (1.3)	4 (1.1)
Type 1 diabetes mellitus + rheumatoid arthritis	0	0	1 (0.2)
Type 1 diabetes mellitus + alopecia areata	0	1 (0.6)	0
Halo nevi	0	10 (6.6)	20 (5.7)
Psoriasis	1 (1.1)	3 (2.0)	9 (2.6)
Alopecia areata	1 (1.1)	3 (2.0)	7 (2.0)
Rheumatoid arthritis	1 (1.1)	3 (2.0)	2 (0.5)
Scleroderma	1 (1.1)	0	0
Total	9 (10.4)	36 (24.0)	113 (32.4)

n, number of total available cases of vitiligo of each clinical form presenting co-morbidity autoimmune. The information about presence/absence of autoimmune co-morbidity was not available for 11 individuals, 2 with segmental, 2 with acrofacial and 7 with vulgaris vitiligo.
% proportion: number of cases of vitiligo of each clinical form presenting co-morbidity autoimmune.

($p < 0.001$), and borderline significant between segmental and acrofacial vitiligo ($p = 0.07$). For family history of vitiligo, significant differences were observed between segmental and vulgaris ($p < 0.001$) and vulgaris and acrofacial disease ($p = 0.001$). For KP, all two-by-two comparisons reached statistical significance even after Bonferroni correction for multiple testing ($p < 0.001$) (Table

3). A gradient of distribution of age of onset across the three clinical types of vitiligo was also detected ($p < 0.001$), with lowest, intermediate and higher means of age of onset observed for segmental, vulgaris and acrofacial cases, respectively (Table 3, Fig. 1). No association was observed between co-morbidity autoimmune and both age of onset ($p = 0.09$) and occurrence of

Table 3
Association analysis between clinical types and autoimmune co-morbidity, vitiligo family history, Köebner phenomenon and age of vitiligo onset.

	Segmental	Vulgaris	Acrofacial	p-Value ^a
Autoimmune co-morbidity ^f	(n=80)	(n=306)	(n=126)	<0.001 ^b
No (%)	56 (70.0)	145 (47.3)	72 (57.1)	
Yes (%)	24 (30.0)	161 (52.6)	54 (42.8)	
Vitiligo family history	(n=81)	(n=317)	(n=135)	<0.001 ^c
No (%)	65 (80.2)	188 (59.3)	101 (74.8)	
Yes (%)	16 (19.7)	129 (40.6)	34 (25.1)	
Köebner phenomenon	(n=84)	(n=331)	(n=136)	<0.001 ^d
No (%)	79 (94.0)	152 (45.9)	99 (72.8)	
Yes (%)	5 (5.9)	179 (54.1)	37 (27.2)	
Age of vitiligo onset	(n=86)	(n=345)	(n=150)	<0.01 ^e
Average	16	23.9	29.1	
Median	13	22	28.5	
Min-max (SD)	1-52 (12.5)	1-69 (15.5)	0.5-61 (14.3)	

n, number of individuals with available data for each co-variable.

^a Chi-square.

^b Segmental × Vulgaris ($p < 0.001$); Segmental × Acrofacial ($p = 0.07$); Vulgaris × Acrofacial ($p = 0.7$). Fisher ($p < 0.017$, Bonferroni correction).

^c Segmental × Vulgaris ($p < 0.001$); Segmental × Acrofacial ($p = 0.40$); Vulgaris × Acrofacial ($p = 0.001$). Fisher ($p < 0.017$, Bonferroni correction).

^d Segmental × Vulgaris ($p < 0.001$); Segmental × Acrofacial ($p < 0.001$); Vulgaris × Acrofacial ($p < 0.001$). Fisher ($p < 0.017$, Bonferroni correction).

^e ANOVA and LSD test for multiple comparisons. Age in years, SD (standard deviation).

^f Occurrence of co-morbidity autoimmune in the nuclear family; data from families with available information: Segmental × Vulgaris ($p < 0.001$); Segmental × Acrofacial ($p < 0.001$); Vulgaris × Acrofacial ($p = 0.001$).

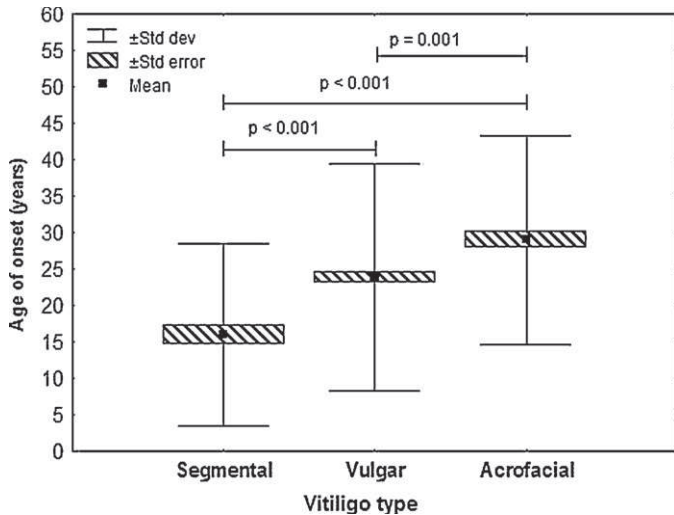


Fig. 1. Distribution of mean age of onset across the three clinical types of vitiligo.

KP ($p = 0.4$). Multivariate logistic regression analysis confirmed independence of all positive association signals observed (supplementary Table 1).

4. Discussion

Despite several studies demonstrating association between different clinical features of vitiligo and the form of manifestation of the disease [17,26,29], the most commonly used classification protocols for vitiligo are still defined exclusively by the number and location of the lesions [8]. How these current classification schemes reflect possible different pathophysiological basis for the disease is currently unknown.

Few studies have used quantitative analyses to investigate vitiligo progression, taking into account clinical type of disease, as well as often associated clinical features such as age of onset, occurrence of KP, autoimmune co-morbidity and family history of disease [26,29]. As consequence, one major clinical limitation in vitiligo is the difficulty to predict the evolution of the disease. One can speculate that a combined analysis of these commonly observed clinical features associated with vitiligo could sharpen

vitiligo classification, adding prognostic value to the protocol that might be of particular importance in early-diagnosed disease.

Our study detected statistically significant differences in the global distribution of all studied variables and the three most prevalent clinical forms of vitiligo, using both univariate and multivariate strategies of analysis. When compared two-by-two, statistical significance was not reached only when acrofacial and segmental vitiligo were compared for autoimmune co-morbidity and family history of disease, perhaps due to the smaller number of individuals affected by these two forms of disease (Table 3). Interestingly, the binary variables (occurrence of autoimmune co-morbidity, KP and family history of vitiligo) behaved similarly, revealing a pattern of distribution in which the risk of occurrence of all three features, as estimated by the OR, was higher in vulgaris and lower in segmental vitiligo, with intermediate risk for acrofacial disease (supplementary Table 1, Fig. 2). This is in accordance with previous results showing that segmental vitiligo patients frequently present typical features that help distinguishing from vulgaris vitiligo, such as low frequency of family history, co-occurrence of autoimmune diseases and KP [17]. Also, assuming that the occurrence of these variables indicates a stronger genetic background controlling the disease, as suggested by previous studies [18,21], vulgaris vitiligo would be the clinical type most likely to have the strongest genetic control. Indeed, a recent, family-based study performed in the same population described here demonstrated association between vitiligo and genetic markers of the *Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1)* gene, that encodes an important mediator of melanocyte adhesion on basal membrane, an effect possibly concentrated on non-segmental cases [30]. Finally, our data might help explain the different, apparently discordant prevalences of KP observed in vitiligo when not taking into account the clinical forms of disease [15,27,31].

Age of onset was also associated with clinical form of vitiligo, however, not following the same pattern observed for the binary variables. It was of interest that in our population sample (including all clinical types of disease), early age of onset was not associated with family history of disease (mean age of onset of 23.9 and 24.1 years for absence or presence of family history, respectively), as previously described for generalized vitiligo [21]. This indicates that, in our sample, early disease occurrence is not a good indicator of a familial effect. Important, it was possible that the large difference on age of onset observed across the three

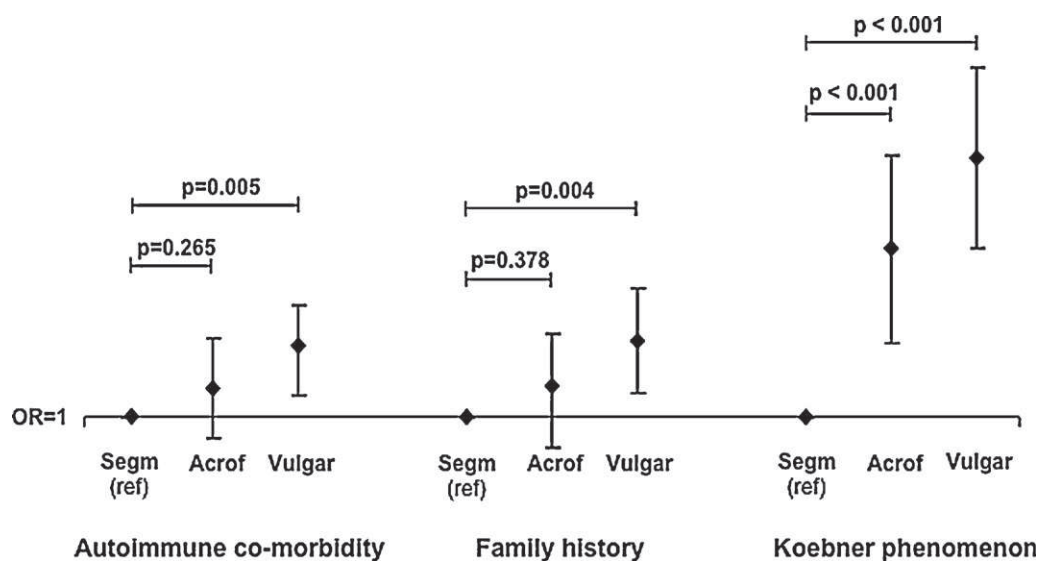


Fig. 2. Gradient of chance of occurrence of autoimmune co-morbidity, KP and family history across the three clinical types of vitiligo. Values of the OR, as described in details on supplementary Table 1, are plotted using a logarithm scale. Segm, segmental vitiligo; Acrof, acrofacial vitiligo; Vulgar, vulgaris vitiligo.

clinical groups was acting as a confounding factor – however, multivariate analysis controlling for such differences confirmed the observed association.

In a clinical context, our observations may be of prognostic value for disease progression when diagnosed early – large, prospective studies are needed to confirm this hypothesis. This may be of particular importance for KP, the only binary variable significantly associated in all two-by-two comparisons: it has been postulated in previous studies that KP may indicate active disease [32]; however it is unclear whether patients with positive history of KP have a different prognosis when compared to patients with no history of the event [28]. An intriguing possibility is that the entire skin of a vitiligo affected individual – and not only the affected segments – is modified [33]. For example, a histopathological analysis indicated microscopic abnormalities in biopsy samples of apparently healthy skin of 28 patients with common vitiligo (as classified by the authors), obtained as far as 15 cm distant from a lesion [34]. In this context, occurrence of KP may reflect the existence – and be a marker – of skin predisposed to develop vitiligo lesions, with a particularly important impact upon disease classification and prognosis. Finally, the use of the clinical variables studied here to refine the definition of vitiligo clinical forms may have a positive impact over research initiatives on the molecular basis of the pathogenesis of the disease, such as studies of genetic risk factors for vitiligo susceptibility.

Funding

This investigation was partially supported by Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Research Office of the Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jdermsci.2011.09.011.

References

- [1] Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Dutrieux RP, Das PK. Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. *J Invest Dermatol* 1993;100(June (6)):816–22.
- [2] Tobin DJ, Swanson NN, Pittelkow MR, Peters EM, Schallreuter KU. Melanocytes are not absent in lesional skin of long duration vitiligo. *J Pathol* 2000;191(August (4)):407–16.
- [3] Howitz J, Brodthagen H, Schwartz M, Thomsen K. Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Arch Dermatol* 1977;113(January (1)):47–52.
- [4] Mehta NR, Shah KC, Theodore C, Vyas VP, Patel AB. Epidemiological study of vitiligo in Surat area, South Gujarat. *Indian J Med Res* 1973;61(January (1)):145–54.
- [5] Spritz RA, Gowan K, Bennett DC, Fain PR. Novel vitiligo susceptibility loci on chromosomes 7 (AIS2) and 8 (AIS3), confirmation of SLEV1 on chromosome 17, and their roles in an autoimmune diathesis. *Am J Hum Genet* 2004;74(January (1)):188–91.
- [6] Huggins RH, Schwartz RA, Janniger CK. Vitiligo. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2005;14(December (4)):137–42. 44–5.
- [7] Ortonne J-P, Mosher DB, Fitzpatrick TB. Vitiligo and other hypomelanoses of hair and skin. New York: Plenum Medical Book Co.; 1983.
- [8] Taieb A, Picardo M. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res* 2007;20(February (1)):27–35.
- [9] Gawkrödger DJ, Ormerod AD, Shaw L, Mauri-Sole I, Whitton ME, Watts MJ, et al. Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. *Br J Dermatol* 2008;159(November (5)):1051–76.
- [10] Bose SK. Probable mechanisms of loss of Merkel cells in completely depigmented skin of stable vitiligo. *J Dermatol* 1994;21(October (10)):725–8.
- [11] Schallreuter KU, Gibbons NC, Zothner C, Elwary SM, Rokos H, Wood JM. Butyrylcholinesterase is present in the human epidermis and is regulated by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349(October (3)):931–8.
- [12] Le Poole IC, Wankowicz-Kalinska A, van den Wijngaard RM, Nickloff BJ, Das PK. Autoimmune aspects of depigmentation in vitiligo. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2004;9(January (1)):68–72.
- [13] 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. *Br J Dermatol* 2003;148(January (1)):95–101.
- [14] Lee AY, Kim NH, Choi WI, Youm YH. Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *J Invest Dermatol* 2005;124(May (5)):976–83.
- [15] Schallreuter KU, Lemke R, Brandt O, Schwartz R, Westhofen M, Montz R, et al. Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. *Dermatology* 1994;188(4):269–75.
- [16] Rezaei N, Gavalas NG, Weetman AP, Kemp EH. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21(August (7)):865–76.
- [17] Hann SK, Lee HJ. Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. *J Am Acad Dermatol* 1996;35(November (5 Pt 1)):671–4.
- [18] 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 Res* 2003;16(June (3)):208–14.
- [19] Liu JB, Li M, Yang S, Gui JP, Wang HY, Du WH, et al. Clinical profiles of vitiligo in China: an analysis of 3742 patients. *Clin Exp Dermatol* 2005;30(July (4)):327–31.
- [20] Van Geel N, De Lille S, Vandenhoute S, Gauthier Y, Mollet I, Brochez L, et al. Different phenotypes of segmental vitiligo based on a clinical observational study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010 September.
- [21] 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 Res* 2005;18(August (4)):300–5.
- [22] Alcáiz A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 2007;39(April (4)):517–22.
- [23] Alzolibani A. Genetic epidemiology and heritability of vitiligo in the Qassim region of Saudi Arabia. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2009;18(September (3)):119–25.
- [24] Weiss G, Shemer A, Trau H. The Koebner phenomenon: review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002;16(May (3)):241–8.
- [25] Dogra S, Parsad D, Handa S, Kanwar AJ. Late onset vitiligo: a study of 182 patients. *Int J Dermatol* 2005;44(March (3)):193–6.
- [26] Hann SK, Chun WH, Park YK. Clinical characteristics of progressive vitiligo. *Int J Dermatol* 1997;36(May (5)):353–5.
- [27] Barona MI, Arrunategui A, Falabella R, Alzate A. An epidemiologic case-control study in a population with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1995 Oct;33(4):621–5.
- [28] Njoo MD, Das PK, Bos JD, Westerhof W. Association of the Koebner phenomenon with disease activity and therapeutic responsiveness in vitiligo vulgaris. *Arch Dermatol* 1999;135(April (4)):407–13.
- [29] Chun WH, Hann SK. The progression of nonsegmental vitiligo: clinical analysis of 318 patients. *Int J Dermatol* 1997;36(December (12)):908–10.
- [30] de Castro CC, do Nascimento LM, Walker G, Werneck RI, Noguece E, Mira MT. Genetic variants of the DDR1 gene are associated with vitiligo in two independent Brazilian population samples. *J Invest Dermatol* 2010 February.
- [31] Handa S, Dogra S. Epidemiology of childhood vitiligo: a study of 625 patients from north India. *Pediatr Dermatol* 2003;20(May–June (3)):207–10.
- [32] Hatchome N, Kato T, Tagami H. Therapeutic success of epidermal grafting in generalized vitiligo is limited by the Koebner phenomenon. *J Am Acad Dermatol* 1990;22(January (1)):87–91.
- [33] Boissy RE, Liu YY, Medrano EE, Nordlund JJ. Structural aberration of the rough endoplasmic reticulum and melanosome compartmentalization in long-term cultures of melanocytes from vitiligo patients. *J Invest Dermatol* 1991;97(September (3)):395–404.
- [34] Moellmann G, Klein-Angerer S, Scollay DA, Nordlund JJ, Lerner AB. Extracellular granular material and degeneration of keratinocytes in the normally pigmented epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 1982;79(November (5)):321–30.