



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Mestrado em Ciências da Saúde

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

LILIANE MACHADO DO NASCIMENTO

Curitiba
2009

LILIANE MACHADO DO NASCIMENTO

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

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de mestrado em
Ciências da Saúde e passagem direta para o doutorado

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Mestrado em Ciências da Saúde

Orientador: Marcelo Távora Mira

Curitiba

2009

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

Nascimento, Liliane Machado do
N244e Estudo de fatores de risco genéticos de suscetibilidade ao vitiligo : análise de
2009 genes candidatos / Liliane Machado do Nascimento ; orientador, Marcelo
Távora Mira. -- 2009.
 xiii, 66 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2009
Bibliografia: 51-59

1. Vitiligo. 2. Doença crônica. 3. Genes. 4. Ciências médicas. I. Mira, Marcelo
Távora. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 610



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

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

Aos vinte e oito dias do mês de agosto de 2009, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "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 mestre; 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. Iara José de Messias Reason UFPR	

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

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

Conceito: Aprovada

Profª. Drª. Paula Cristina Trevilatto

Conceito: Aprovada

Profª. Drª. Iara José de Messias Reason

Conceito: Aprovada

Conceito Final: Aprovada

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 pais, Severino e Marilene e ao meu esposo Heber”.

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*, pelo amor incondicional e por estarem sempre presentes, participando das minhas conquistas, me incentivando e acreditando que eu sou capaz.

Ao meu marido, *Heber*, meu porto seguro, obrigada pela paciência durante todos esses anos, pelo companheirismo e por entender as minhas ausências. E claro, não poderia deixar de agradecer pela ajuda na digitação de todas as planilhas no formato *linkage*!!

Ao *Marcelo Távora Mira*, meu orientador, um exemplo de pesquisador que me espelharei daqui para frente, obrigado pelos ensinamentos ao longo desses anos que contribuíram para a minha formação científica e pela confiança. Você terá a minha eterna admiração.

Ao meu amigo e colega de Mestrado *Caio Castro*, que me contagiou com sua paixão pelo vitiligo e pela pesquisa. Esteve presente em cada etapa do meu projeto, considero meu Co-orientador. E também, responsável pelo recrutamento dessa belíssima população.

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

Ângela Schneider Frâncio, Caio Castro, Denise Endo da Costa, Felipe César Gomes Fernandes, Fernando Panissa Lázaro, Flávia Prevedello, Geison Cambri, Marcela Ferreira Dias, Renata Helena Sindeux, Raphaela de Paula Pimentel, Vinícius Fava.

Aos professores que participaram da comissão de acompanhamento de projeto (CAP), em especial agradeço ao *Prof Dr. Fabio Faucz*, a *Prof Dra. Paula Trevillato* e a *Prof Dra Vanessa Sotomaior*.

A *Cynthia Chester* e *Prof Dr Milton Moraes* – FIOCRUZ-RJ, pelo apoio com métodos laboratoriais de genotipagem por PCR-RFLP e TaqMan-discriminação alélica como também por participarem da genotipagem de algumas amostras e contribuírem com algumas idéias para o desenvolvimento deste estudo.

A minha amiga e colega de mestrado *Renata Werneck*, cuja colaboração na análise estatística foi de suma importância.

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.

"Se pude enxergar mais longe foi porque
estava sobre os ombros de gigantes"
(Isaac Newton)

RESUMO

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

O vitiligo é uma doença crônica, adquirida, multifatorial e poligênica 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. Entre as teorias propostas para explicar a patogênese do vitiligo, a hipótese autoimune e genética são as mais aceitas entre os especialistas. Diversos genes que apresentam papel na regulação da imunidade foram associados à suscetibilidade ao vitiligo, incluindo *CTLA-4*, *AIRE*, *NALP1* e *PTPN22*, loci de suscetibilidade autoimune como AIS1, AIS2 e SLEV1 e ainda certas especificidades HLA. Os objetivos deste estudo foram (i) replicar achados anteriores de associação entre polimorfismos dos genes *NALP1* e *TNFA-308* à ocorrência de vitiligo; (ii) testar pela primeira vez polimorfismo do gene *LTA* ao controle da suscetibilidade à doença. A população estudada foi formada por 199 famílias nucleares compostas por indivíduos afetados com vitiligo e seus pais procedentes dos estados de Santa Catarina e Paraná. Adicionalmente, foram recrutados 121 indivíduos não-relacionados afetados com vitiligo e 134 indivíduos controles sem histórico de vitiligo e doenças autoimunes, pareados de acordo com idade e sexo, para compor uma população caso-controle. A genotipagem do *LTA+252* foi realizada através de PCR-RFLP e os marcadores dos genes *NALP1* e *TNFA-308*, através do sistema TaqMan de discriminação alélica. Nossos resultados mostram evidência de associação entre vitiligo *per se* e o alelo “A” do marcador rs6502867 do gene *NALP1* ($p=0,03$) e o alelo “A” do gene *LTA+252* ($p=0,04$), nas análises de regressão logística condicionada e TDT. Foi encontrada evidência marginal de associação ($p=0,06$) entre vitiligo e o gene *LTA+252*, na população caso-controle. Não foi encontrada evidência de associação entre vitiligo *per se* e os alelos do gene *TNFA-308* em nenhum dos modelos testados. O haplótipo formado entre o alelo “G” do gene *LTA+252* e o alelo “G” do gene *TNFA-308* foi subtransmitido em nossa amostra populacional ($p=0,03$) sugerindo um efeito de proteção ao vitiligo. Estes dados sugerem que os genes *NALP1* e *LTA* podem apresentar um papel na suscetibilidade ao vitiligo.

Palavras-Chaves: Vitiligo, *NALP1*, *TNFA*, *LTA*

ABSTRACT

ANALYSIS OF GENETIC RISK FACTORS FOR VITILIGO SUSCEPTIBILITY - CANDIDATE GENES

Vitiligo is a chronic, acquired, multifactorial and polygenic disease characterized by the appearance of patches of depigmented skin, overlying hair and mucous membranes, as a result of absence of functioning melanocytes in the involved areas. Among the proposed theories to explain the pathogenesis of vitiligo, the autoimmune and genetic hypothesis are the most accepted by the specialists. Several genes that show a role in the regulation of immune response have been associated with susceptibility to vitiligo, including: *CTLA-4*, *AIRE*, *NALP1* and *PTPN22*, autoimmune susceptibility loci such as *AIS1*, *AIS2* and *SLEV1* and certain HLA specificities. The aim of this study were (i) to replicate previous association reports between markers of *NALP1* gene and the *TNF-308* polymorphism and vitiligo occurrence; (ii) to test the *LTA+252* polymorphism, for the first time, as a candidate variant for the control of disease susceptibility. The studied population was composed of 199 nuclear families formed by vitiligo affected individuals and their parents, recruited from the states of Santa Catarina and Paraná. Additionally, were recruited 121 unrelated individuals with vitiligo *per se* and 134 controls without vitiligo and autoimmune disease, matched by age and gender, composed a case-control population. The *LTA+252* genotyping was performed by PCR-RFLP; markers of *NALP1* gene and *TNFA-308* were genotyped by allelic discrimination TaqMan assay. Our results showed association between vitiligo *per se* and the allele "A" of the rs6502867 of the *NALP1* gene ($p=0.03$) and the allele "A" of *LTA+252* ($p=0.04$), as detected by logistic regression and TDT analyses. Association between vitiligo and *LTA+252* was replicated in the case-control population, with borderline significance ($p=0.06$). There was no evidence for association between vitiligo *per se* and the allele of the *TNFA-308* in neither of the tested models. The haplotype composed by allele "G" of *LTA+252* gene and the allele "G" of *TNFA-308* gene was sub-transmitted in our population ($p=0.03$) suggesting a protection effect. Our results suggest that the *NALP1* and *LTA* genes may be involved in the genetic control of vitiligo susceptibility.

Keywords: Vitiligo, *NALP1*, *TNFA*, *LTA*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Descrição dos antígenos HLA associados ao vitiligo em diferentes grupos étnicos	8
Quadro 2	Oligonucleotídeos e condições de ciclagem usados e tamanho do fragmento gerado na PCR para amplificação do polimorfismo +252 do gene <i>LTA</i>	24
Quadro 3	Reação de digestão do polimorfismo do gene <i>LTA</i> com enzima de restrição NcoI-NEB e tamanho dos fragmentos observados	25
Quadro 4	Identificação dos marcadores e alelos polimórficos para os genes <i>NALP1</i> e <i>TNFA</i>	26
Quadro 5	Cronograma de execução das atividades do doutorado	50
Figura 1	Representação esquemática do <i>loci TNFA</i> e <i>LTA</i> na região de classe III do MHC no cromossomo 6	12
Figura 2	Desenho geral do estudo	18
Figura 3	Padrão de bandas após digestão com enzima de restrição NcoI-NEB dos amplicons contendo o polimorfismo +252 do gene <i>LTA</i>	25
Figura 4	Padrão dos <i>clusters</i> alelo-específicos discriminados de acordo com a intensidade de fluorescência detectada no comprimento de onda dos fluoróforos VIC TM e FAM TM	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais genes e regiões candidatas não-MHC relacionadas ao vitiligo.....	11
Tabela 2	Características demográficas e clínicas dos indivíduos afetados com vitiligo na população estudada.....	21
Tabela 3	Análise de associação dos SNPs do gene <i>NALP1</i> com vitiligo <i>per se</i>	30
Tabela 4	Haplótipo entre marcadores do gene <i>NALP1</i>	31
Tabela 5	Análise de regressão logística condicionada do rs6502867 do gene <i>NALP1</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.....	32
Tabela 6	Análise de associação do gene <i>LTA +252</i> com vitiligo <i>per se</i>	33
Tabela 7	Análise de regressão logística condicionada do gene <i>LTA+252</i> estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença	34
Tabela 8	Análise de associação do gene <i>TNFA-308</i> com vitiligo <i>per se</i>	35
Tabela 9	Haplótipo entre polimorfismos gênicos <i>LTA+252</i> e <i>TNFA-308</i>	35
Tabela 10	Análise caso-controle do polimorfismo +252 do gene <i>LTA</i>	36
Tabela 11	Relação dos genes genotipados na plataforma Sequenom®.....	48

LISTA DE ABREVIATURA

- a.C. – antes de Cristo
- ACE – Enzima Conversora de Angiotensina
- AIRE – em inglês, *Autoimmune Regulator*
- AIS1 – em inglês, *Autoimmunity Susceptibility Locus 1*
- ASC – em inglês, *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*
- CAT – Catalase
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- COMT – em inglês, *Catechol-O-Methyltransferase*
- CTLA-4 – em inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- dNTPs – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
- EDN1 – em inglês, *Endothelin 1*
- EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
- ESR1 – Receptor do Estrógeno 1
- EUA – Estados Unidos da América
- FAM – Frequência Alélica Mínima
- FAMTM – Sonda marcada com fluoróforo denominado FAMTM
- FAS – em inglês, *TNF receptor superfamily member 6*
- FBAT – Teste de Associação Baseado em Família
- FOXD3 – em inglês, *Forkhead box D3*
- HLA – Antígenos Leucocitário Humano
- IFN α – Interferon Alfa
- IL – Interleucina
- LD – Desequilíbrio de Ligação
- LES – Lupus Eritematoso Sistêmico
- LMP – gene que codifica polipeptídeo de baixo peso molecular
- LOD – Logaritmo das odds de ligação
- LTA – Gene que codifica a citocina LT α
- LT α – Linfotoxina Alfa
- MBL2 – em inglês, *Mannose binding lectin*

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
NALP1 – em inglês, *NACHT leucine-rich repeat protein 1*
NcoI – Nome da Enzima de Restrição
NEB – em inglês, *New England Biolab*
NF-κB – Fator Nuclear kappa B
NOD – em inglês, *nucleotide-binding oligomerization domains*
Nrf2 – em inglês, *NF-E2 related factor 2*
OR – Taxa de Risco (em inglês, *Odds Ratio*)
pb – pares de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PTPN22 – em inglês, *Lymphoid protein tyrosine phosphatase*
PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RFLP – Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição
RR – Risco Relativo
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SLEV1 – nome do *locus* na região 17p13
SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TAP – gene codifica Proteína de processamento de antígeno com transportador associado.
TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDT – Teste de Desequilíbrio de Transmissão
TE – Tampão Tris-EDTA
TKM – Tampão Tris-KCl-MgCl₂
TNFA – Gene que codifica a citocina TNFα
TNFα – Fator de Necrose Tumoral Alfa
U – Unidades
VICTM – Sonda marcada com fluoróforo denominado VICTM

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Definição e Epidemiologia Geral do Vitiligo.....	1
1.2. Contexto Histórico do Vitiligo	1
1.3. Formas Clínicas do Vitiligo	2
1.4. Fisiopatologia do Vitiligo.....	3
1.5. Genética da Suscetibilidade ao Vitiligo	5
1.5.1. Linfotóxina Alfa (<i>LTA</i>) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (<i>TNFA</i>)	12
1.5.2. <i>NALP1 - NACHT leucine-rich repeat protein 1</i>	14
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1. Desenho Geral do Estudo	18
4.2. População Estudada	19
4.2.1. População de Famílias	20
4.2.2. População Caso-Controle	20
4.2.3. Critérios de Inclusão	21
4.2.4. Critérios de Exclusão	22
4.3. Coleta do Material, Extração do DNA e Determinação da Concentração de DNA nas Amostras	22
4.4. Análise Molecular	23
4.4.1. Genotipagem do polimorfismo +252 gene <i>LTA</i> - Amplificação por PCR	23
4.4.2. Genotipagem do polimorfismo +252 gene <i>LTA</i> - Análise por RFLP.....	24
4.4.3. Genotipagem dos polimorfismos dos genes <i>TNFA</i> e <i>NALP1</i> - Discriminação Alélica	26
4.5. Análise Estatística	28
5. RESULTADOS	30

5.1. Análise de associação baseado em famílias	30
5.1.1. <i>NALP1</i> (<i>NACHT leucine-rich repeat protein 1</i>).....	30
5.1.1.1. Análise de associação do gene <i>NALP1</i> com vitiligo <i>per se</i>	30
5.1.1.2. Análise haplotípica entre marcadores do gene <i>NALP1</i>	31
5.1.1.3. Análise do marcador rs6502867 do gene <i>NALP1</i> estratificada por forma clínica, idade e doenças autoimunes associadas	31
5.1.2. <i>LTA</i> (Linfotoxina Alfa)	32
5.1.2.1. Análise de associação do polimorfismo +252 <i>LTA</i> com vitiligo <i>per se</i>	32
5.1.2.2. Análise do polimorfismo +252 do gene <i>LTA</i> estratificada por forma clínica, idade e doenças autoimunes associadas	33
5.1.3. <i>TNFA</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)	34
5.1.3.1. Análise de associação do polimorfismo -308 do gene <i>TNFA</i> com vitiligo <i>per se</i>	34
5.1.4. Análise haplotípica entre os polimorfismos gênicos <i>LTA</i> +252 e <i>TNFA</i> -308....	35
5.2. Análise de associação caso-controle - replicação	36
5.2.1. Análise de associação do polimorfismo +252 do gene <i>LTA</i> com vitiligo <i>per se</i>	36
6. DISCUSSÃO.....	37
6.1. <i>NALP1</i> (<i>NACHT leucine-rich repeat protein 1</i>).....	39
6.2. <i>LTA</i> (Linfotoxina Alfa).....	42
6.3. <i>TNFA</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)	44
6.4. Considerações finais	45
7. CONCLUSÕES.....	46
8. PERSPECTIVAS FUTURAS - PROGRESSÃO PARA O DOUTORADO	47
8.1. Justificativa.....	47
8.2. Metodologia	47
8.2.1. Seleção dos genes e marcadores candidatos.....	47
8.2.2. Genotipagem na plataforma de alto rendimento Sequenom®.....	49
8.3. Resultados Parciais.....	49
8.4. Cronograma	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	60
Anexo 2 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição e Epidemiologia Geral do Vitiligo

O vitiligo é uma doença crônica, adquirida e 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 (Hann, 2000; Nordlund, 2006). Estas manchas acrômicas apresentam diferentes tamanhos, formas e simetria, de acordo com o tipo de vitiligo, com bordas delimitadas raramente eritematosas ou hipercrômicas.

Considerando o fato destes indivíduos não apresentarem produção de melanócitos nas áreas afetadas ocorre uma redução da proteção da pele contra a radiação ultravioleta e aumento do risco de oncogênese. Além disso, como existem melanócitos na retina e ouvido interno, podem também ocorrer anormalidades oculares, sendo uveíte a mais freqüente, ou mesmo perda auditiva neuro-sensorial, conforme detectado em 13 a 16% dos pacientes (Mills Md, 2000). No entanto, uma das principais conseqüências da doença não é fisiológica, mas sim, psicológica: as lesões de pele podem gerar grande impacto sobre a auto-estima dos pacientes e como conseqüência aumento dos casos de depressão grave e um forte sentimento de discriminação social (Porter, 2000).

A doença afeta igualmente ambos os sexos e pode manifestar-se em qualquer idade, sendo a média de idade de início por volta dos 25 anos (Alkhateeb, Fain *et al.*, 2003), podendo ser variável em diferentes regiões geográficas (Majumder, Nordlund *et al.*, 1993). A prevalência do vitiligo tem sido estimada em 0,19% na China (Zhang, Xu *et al.*, 2009), 0,38% na Dinamarca (Howitz, Brodthagen *et al.*, 1977) 1% no EUA (Lerner, 1959) e 1,13% na Índia (Mehta, Shah *et al.*, 1973).

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 já vem sendo descrito há milênios,

com referências em escritos como o Papiro de Ebers, no Egito e o Livro Sagrado Atharva Veda, na Índia, que datam 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 vulgaris*, mas também outras doenças tais como hanseníase, psoríase ou leucodermia pós-inflamatória (Goldman, Moraites *et al.*, 1966; Freilich, 1982).

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 (Kopera, 2000).

1.3. Formas Clínicas do Vitiligo

Vários autores concordam em classificar o vitiligo em “segmentar” e “não-segmentar”, pressupondo-se origens distintas para estes dois grupos (Koga e Tango, 1988; Hann e Lee, 1996). O vitiligo segmentar acomete geralmente jovens, apresenta interrupção da progressão das lesões após um ano e tem menor associação com doenças de etiologia alérgica, endócrina e autoimune (Koga e Tango, 1988; Hann e Lee, 1996; Cho, Kang *et al.*, 2000). A forma segmentar é caracterizada clinicamente por uma distribuição unilateral, assimétrico e dermatomal das manchas, acometendo um ou mais dermatômos (região da pele inervada por ramificação nervosa específica) (Hann e Lee, 1996). A proporção do total de pacientes portadores de vitiligo afetados pela forma segmentar apresenta grande variação inter-étnica. El-Mofty e col. descreveram uma prevalência de 5% em uma população egípcia (El-Mofty e El-Mofty, 1980), e Koga e col., 27,9% em uma população japonesa (Koga e Tango, 1988). História familiar de vitiligo foi reportada em 11,5% dos pacientes afetados por vitiligo segmentar (Hann e Lee, 1996).

O vitiligo não-segmentar inicia-se a qualquer idade, com surgimento de novas lesões ao longo da vida do indivíduo e apresenta características que ligam a sua

patogênese a mecanismos autoimunes, com uma maior frequência de associação com doenças alérgicas ou de origem imunológica (Schallreuter, Lemke *et al.*, 1994). Pacientes com esta forma clínica freqüentemente apresentam fenômeno de Koebner, ou seja, o aparecimento de lesões de vitiligo em áreas de traumatismos (Koga e Tango, 1988). A forma não-segmentar é caracterizada clinicamente por uma distribuição bilateral e simétrica das máculas, as quais variam de tamanho com o tempo. Neste tipo de vitiligo, freqüentemente observa-se agregação familiar de casos, o que sugere a existência de um componente genético no controle da manifestação da doença (Schallreuter, Lemke *et al.*, 1994).

Além da classificação do vitiligo em segmentar e não-segmentar, os indivíduos afetados por vitiligo podem ser classificados em diferentes subtipos clínicos de acordo com os sítios anatômicos afetados ou número de lesões, seguindo a classificação de Ortonne e col. (Ortonne, 2005):

- Vitiligo Segmentar – manchas brancas unilaterais agrupadas em um ou mais dermatômos;
- Vitiligo Focal - uma ou poucas máculas isoladas em determinada área de maneira 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);
- Vitiligo Vulgar ou Generalizado – manchas brancas afetando as mesmas áreas afetadas pelo fenótipo acrofacial e também, tórax, abdômen, membros superiores e inferiores simetricamente distribuídas;
- Vitiligo Universal - todo ou quase todo o tegumento acometido por despigmentação.

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. Destas, a hipótese autoimune é hoje a mais aceita entre os especialistas (Castanet e Ortonne, 1997), devido às seguintes razões: (i) há freqüente co-ocorrência de outras doenças autoimunes em pacientes afetados por vitiligo e seus familiares (Schallreuter, Lemke *et al.*, 1994). Estudo realizado com 2624 indivíduos portadores de vitiligo da América do Norte e Reino Unido e seus familiares de primeiro grau confirmou um aumento significativo da co-ocorrência de cinco doenças: autoimune da tireóide (particularmente hipotireoidismo), anemia perniciosa, doença de Addison, Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) e Doença do intestino irritável (Alkhateeb, Fain *et al.*, 2003); (ii) existem auto-anticorpos circulantes contra antígenos de superfície e citoplasmáticos dos melanócitos, bem como células T específicas em lesões periféricas ativas de alguns pacientes com vitiligo, sugerindo alterações na imunidade humoral e celular (Castanet e Ortonne, 1997; Boone, Ongena *et al.*, 2007); (iii) ocorre repigmentação da pele como resultado 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 (Boone, Ongena *et al.*, 2007).

A hipótese neural é baseada em observações como a distribuição dermatomal do vitiligo segmentar e a origem embriológica comum dos melanócitos e do sistema nervoso, ambos derivados da crista neural (Lin e Fisher, 2007). Alterações na via das catecolaminas, como o aumento da atividade da catecol-o-etiltransferase e monoamino oxidase, bem como da expressão de β 2-adrenoreceptores, têm sido descritas em lesões de vitiligo (Schallreuter, Wood *et al.*, 1996). Essas alterações são responsáveis por induzir disfunções e dano aos melanócitos por promover a produção de compostos melanotóxicos; esses mediadores químicos liberados no fim do nervo periférico causariam uma diminuição na produção de melanina (Picardo, Passi *et al.*, 1994).

A teoria de autocitotoxicidade, inicialmente proposta por Lerner em 1971, propõe a perda de um mecanismo intrínseco de proteção dos melanócitos que elimina intermediários tóxicos ou metabólitos formados na via da melanogênese (Fitzpatrick e Freedberg, 2003).

Mais recentemente, vários investigadores têm proposto a hipótese de o vitiligo ser causado por um desequilíbrio no controle da morte de melanócitos por apoptose (Huang, Nordlund *et al.*, 2002; Lee, Youm *et al.*, 2004; Lee, Kim *et al.*, 2005). 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 (Van Den Wijngaard, Wankowicz-Kalinska *et al.*, 2000).

1.5. Genética da Suscetibilidade ao Vitiligo

Os fatores genéticos que predisõem ao vitiligo vêm sendo investigados desde 1959, quando se sugeriu um modelo autossômico dominante com penetrância incompleta de transmissão da doença (Lerner, 1959). Posteriormente, outros autores postularam um modelo em que alelos recessivos em múltiplos *loci* autossômicos não ligados interagem epistaticamente na patogênese do vitiligo (Majumder, Das *et al.*, 1988). Estudos familiares têm mostrado que o vitiligo não segrega como uma característica mendeliana, o que é sugestivo de uma herança poligênica e multifatorial, sendo seu padrão de herança complexo (Majumder, Nordlund *et al.*, 1993).

A hipótese de o vitiligo ser uma doença com base genética é sustentada pela taxa de 23% de concordância de vitiligo observada para 22 pares de gêmeos monozigóticos em comparação com 0% em 24 pares de gêmeos dizigóticos (Alkhateeb, Fain *et al.*, 2003). Recentemente, uma análise envolvendo 160 famílias dos EUA confirmou agregação familiar de casos, com 20% dos afetados apresentando ao menos um familiar de primeiro grau com vitiligo (Majumder, Nordlund *et al.*, 1993). O risco relativo (RR) de vitiligo estimado levando em consideração as prevalências encontradas na Dinamarca e Índia foi de sete para pais, 12 para irmãos e 36 para filhos (Majumder, Nordlund *et al.*, 1993). O RR de vitiligo para familiares de primeiro grau foi estimado entre sete a 10 vezes maior em relação à população em geral (Nath, Majumder *et al.*, 1994).

Evidência adicional da existência de um componente genético de suscetibilidade ao vitiligo, também vem sendo obtida a partir de análises de segregação complexa. Arcos-Burgos e col. 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, co-segregando de modo dominante e sem influência de fatores ambientais; e (ii) aqueles com aparecimento tardio da doença, co-segregando com o genótipo recessivo e sofrendo forte influência de fatores ambientais (Arcos-Burgos, Parodi *et al.*, 2002).

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 vitiligo localizado, generalizado, 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 (Zhang, Liu *et al.*, 2004). Os autores concluíram que diferentes tipos de vitiligo são regulados por diferentes conjuntos de genes, reforçando o caráter oligo/poligênico da doença.

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

Estudos de ligação têm desempenhado um importante papel na elucidação do componente genético do vitiligo. Nath *et al.*, 2001 identificaram evidência de ligação entre vitiligo associado ao LES e marcadores do cromossomo 17p13 em 16 famílias Euro-Americana, afetadas com LES e vitiligo, selecionadas de um painel de 92 pedigrees *multiplex* com LES. Análise de ligação não-paramétrica resultou no LOD score significativo de 4,02 ($p = 2,8 \times 10^{-5}$) para esse *locus*, denominado pelos autores de SLEV1 (Nath, Kelly *et al.*, 2001). Um recente estudo de associação, realizado em 114 famílias estendidas da América do Norte e do Reino Unido, envolvendo marcadores do *locus* SLEV1, resultou na identificação do gene *NALP1* como o melhor candidato localizado nesta região genômica. Estudos posteriores de mapeamento fino de associação usando marcadores do tipo Polimorfismo de Nucleotídeo Único (em inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) cobrindo toda a extensão do gene *NALP1* e estendendo-se por 224kb da sua região promotora, mostrou associação de variantes específicas do gene *NALP1* e vitiligo associado a

outras doenças autoimunes e inflamatórias, nessas mesmas famílias. Nesse trabalho, uma análise de regressão logística indicou que pelo menos duas variantes contribuíam independentemente para o risco da doença (Jin, Mailloux *et al.*, 2007). Subseqüentemente, a associação genética entre vitiligo e *NALP1* foi confirmada em um estudo caso-controle independente em uma população da Romênia formada por 66 indivíduos afetados e 93 controles (Jin, Birlea *et al.*, 2007).

Análise de ligação tanto paramétrica como não-paramétrica detectou evidência positiva de 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. No mesmo estudo, a análise foi repetida com a adição de mais 26 famílias (LOD score não-paramétrico = 4,16; $p = 8,5 \times 10^{-4}$) (Alkhateeb, Stetler *et al.*, 2002). 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 não-paramétrico = 5,56; $p = 2,82 \times 10^{-7}$) (Fain, Gowan *et al.*, 2003). 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 = 3,73; $p = 2,08 \times 10^{-5}$) e 8 (LOD = 3,36; $p = 4,18 \times 10^{-5}$) (Spritz, Gowan *et al.*, 2004). No entanto, 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 (Alkhateeb, Stetler *et al.*, 2002), o LOD score paramétrico total das outras 26 famílias estudadas cai para 1,24, sugerindo um efeito genético exclusivo ao primeiro pedigree. 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 (Alkhateeb, Fain *et al.*, 2005).

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 não-paramétrico = 4,62; $p = 3,0 \times 10^{-6}$), além de sinais sugestivos de ligação em outros cinco *loci*, 1p36, 6p21-22, 6q24-q25, 14q12-q13 e 22q12 (Chen, Huang *et al.*, 2005). Em estudo

subseqüente, dois *loci* atingiram significância estatística após a adição de 37 famílias as 106 anteriores: *locus* 22q12 (LOD score não-paramétrico = 4,14; $p = 1,5 \times 10^{-5}$) e 6p21-p22 (LOD score não-paramétrico = 4,10; $p = 1,8 \times 10^{-5}$) (Liang, Yang *et al.*, 2007).

Estudos de ligação bem sucedidos, como os citados acima, localizam *loci* co-segregando com o fenótipo de interesse em regiões genômicas que compreendem dezenas de genes. Assim, 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.

Diversos estudos têm reportado associação entre variantes de genes HLA com suscetibilidade para desenvolver vitiligo em diferentes grupos étnicos (Metzker, Zamir *et al.*, 1980; Foley, Lowe *et al.*, 1983; Dunston e Halder, 1990; Finco, Cuccia *et al.*, 1991; Lorini, Orecchia *et al.*, 1992; Orecchia, Perfetti *et al.*, 1992; Venneker, Westerhof *et al.*, 1992; Al-Fouzan, Al-Arbash *et al.*, 1995; Venkataram, White *et al.*, 1995; Tastan, Akar *et al.*, 2004) (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 controle, 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, Dw7	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

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

Em geral esses estudos não têm encontrado associação consistente entre a ocorrência de vitiligo e alelos HLA, com exceção do alelo HLA-DR4. Uma meta-

análise, realizada por Liu e col., encontrou associação entre vitiligo e HLA-A2 (Liu, Li *et al.*, 2007). Estudos recentes, 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 (Zamani, Spaepen *et al.*, 2001); alelos dos genes HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401 e HLA-DRB1*0701 em turcos (Tastan, Akar *et al.*, 2004), alelos dos genes DRB1*0701, DQB1*0201 e DPB1*1601 em eslovacos (Buc, Fazekasova *et al.*, 1998) e o alelo 122 do microsatélite D6S265, localizado no cromossomo 6p21.3-p21.4 em colombianos (Arcos-Burgos, Parodi *et al.*, 2002). Em famílias *multiplex* caucasianas com vitiligo generalizado, o haplótipo MHC classe II HLA-DRB1*04-(DQA1*0302)-HLADQB1*0301 estava associado tanto com aumento de risco ao vitiligo como com início precoce da doença (Fain, Babu *et al.*, 2006). Em chineses da etnia Han, o haplótipo HLA A25-Cw*0602-DQA1*0302 estava associado com vitiligo generalizado (Xia, Zhou *et al.*, 2006).

Associação genética, em estudos do tipo caso-controle e baseado em famílias, foi relatada entre alelos de marcadores do gene *LMP/TAP*, localizado na região MHC, com vitiligo generalizado de início precoce (Casp, She *et al.*, 2003). Namian e col. observaram que o polimorfismo funcional -308 do gene MHC classe III *TNFA* determina a suscetibilidade ao vitiligo em iranianas do sexo feminino $p = 0,0001$ (Namian, Shahbaz *et al.*, 2009). 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.

A investigação de genes candidatos localizados fora da região do MHC tem levado a resultados promissores. Em uma análise de gene candidato utilizando-se um desenho de associação baseado em populações, Casp e col. encontraram alelos de marcadores intragênicos no gene *CAT* associados ao vitiligo em uma população caucasiana (Casp, She *et al.*, 2002). Mais recentemente, usando desenho de estudo semelhante, Park e col. replicaram este achado em uma população coreana formada por 118 indivíduos afetados e 200 controles (Park, Ha *et al.*, 2006). Entre outros genes candidatos analisados, usando análise de associação caso-controle e/ou baseado em famílias, evidência para associação com fenótipos do vitiligo foi

encontrada para marcadores dos genes *CTLA-4* (Kemp, Ajjan *et al.*, 1999; Blomhoff, Kemp *et al.*, 2005), *ACE* (Jin, Park, Li, Lee, Hong, Hong *et al.*, 2004), *PTPN22* (Canton, Akhtar *et al.*, 2005; Laberge, Bennett *et al.*, 2008), *ESR1* (Jin, Park, Li, Lee, Hong, Hong *et al.*, 2004), *COMT* (Tursen, Kaya *et al.*, 2002), *MBL2* (Onay, Pehlivan *et al.*, 2007), *EDN1* (Kim, Choi *et al.*, 2007), *FAS* (Li, Sun *et al.*, 2008), *AIRE* (Tazi-Ahnini, Mcdonagh *et al.*, 2008), *Nrf2* (Lu, Yu *et al.*, 2008). A tabela 1 resume as principais informações sobre os estudos dos genes e regiões genômicas não-MHC candidatas relacionadas ao vitiligo.

Classicamente, dois critérios são utilizados para a seleção de genes candidatos para estudos de associação: (i) evidência prévia de associação ou ligação; e (ii) papel relevante na patogênese da doença. Segundo esses critérios, três genes candidatos foram selecionados para análise neste estudo, e serão descritos em detalhes a seguir: os genes do MHC classe III *TNFA* e *LTA*, e o gene não-MHC *NALP1*.

Tabela 1: Principais genes e regiões candidatas não-MHC relacionadas ao vitiligo

REGIÃO CANDIDATA	DESENHO	FENÓTIPO	TIPO DE ESTUDO	CROMOSSOMO	ESTATÍSTICA	POPULAÇÃO	AUTOR	ANO
Região 4q13-q21	scan genômico	Generalizado	Ligação		LOD n/p = 4,62 P=3,0x10-6	Chinesesa	Chen et al,	2005
Região 1p Região 7q21 Região 8p21 Região 9q Região 13q Região 17p13	scan genômico	Generalizado	Ligação		LOD= 5,59 P=2,79x10-7 LOD=3,73 P =2,08x10-5 LOD=3,36 P=4,18x10-5 LOD=2,34 P=2,38x10-4 LOD=2,30 P=5,63x10-4 LOD=3,07 P=8,52x10-5 LOD = 3,64 P=4,0x10-5 LOD = 4,59 P= 2,14x10-6	Caucasiana Caucasiana	Spritz et al, Nath et al, Jin et al,	2004 2001 2007
Região 22q11					LOD=2,98 P=1,06x10-4 LOD n/p=4,14 P=1,5x10-5	Caucasiana Chinesesa	Spritz et al, Liang et al,	2004 2007
Região 6p21-p22 Região 6q24-q25 Região 1p36	scan genômico	Generalizado	Ligação		LOD n/p=4,10 P=1,8x10-5 LOD n/p=3,33 P=3,8x10-4 LOD n/p=2,59 P=4,2x10-3	Chinesesa	Liang et al,	2007
GENE CANDIDATO								
<i>NALP1</i>	Baseado em família Caso-controle	Generalizado	Associação	17p13	P< 0,001 P< 0,03	Caucasiana	Jin et al, Jin et al,	2007 2007
<i>PTPN22</i>	Caso-controle Baseado em família	Generalizado	Associação	1p13.3-p13.1	P=0,006 P=0,0048	Caucasiana	Canton et al, LaBerge et al,	2005 2008
<i>CTLA-4</i>	Caso-controle	Generalizado	Associação	2q33	P=0,0001	Caucasiana	Kemp et al,	1999
<i>ESR1</i>	Caso-controle	Generalizado/focal	Associação	6q25.1	P=0,034	Coreana	Jin et al,	2004
<i>ECA</i>	Caso-controle	Generalizado/focal	Associação	17q13	P=0,032	Coreana	Jin et al,	2004
<i>COMT</i>	Caso-controle	Não- segmentar	Associação	22q11.21	P=0,047	Caucasiana	Tursen et al,	2002
<i>CAT</i>	Caso-controle Baseado em família	Vitiligo per se Não-segmentar	Associação	11p13	P=0,01 P=0,0024 P=0,047	Coreana Caucasiana	Park et al, Casp et al,	2006 2002
<i>MBL2</i>	Caso-controle	Vitiligo per se	Associação	10q11.2-q21	P<0,001	Caucasiana	Onay et al,	2007
<i>EDN1</i>	Caso-controle	Vitiligo per se	Associação	6p23-24	P<0,0001	Coreana	Kim et al,	2007
<i>FAS</i>	Caso-controle	Não-segmentar	Associação	10q24.1	P=0,006	Coreana	Li et al,	2008
<i>AIRE</i>	Caso-controle	Vitiligo per se	Associação	21q22.3	P=0,003	Caucasiana	Ahnini et al,	2008
<i>Nr12</i>	Caso-controle	Vitiligo per se	Associação	2q31	P<0,01	Coreana	Guan et al,	2008

1.5.1. Linfotoxina Alfa (*LTA*) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (*TNFA*)

A família TNF inclui os genes *LTB*, *TNFA* e *LTA* que codificam as citocinas Linfotoxina Beta ($LT\beta$), Fator de Necrose Tumoral Alfa ($TNF\alpha$) e Linfotoxina Alfa ($LT\alpha$), respectivamente. Esses genes se posicionam em tandem na região 6p21.3, ocupando um segmento de aproximadamente 7 kb na região de classe III do MHC (Nedwin, Naylor *et al.*, 1985; Rink e Kirchner, 1996). A família gênica TNF assemelha-se em organização, estruturando-se em quatro éxons e três íntrons compreendendo individualmente segmentos genômicos de 2,7 a 3,6 kb (Nedwin, Naylor *et al.*, 1985; Economou, Rhoades *et al.*, 1989) (figura 1).

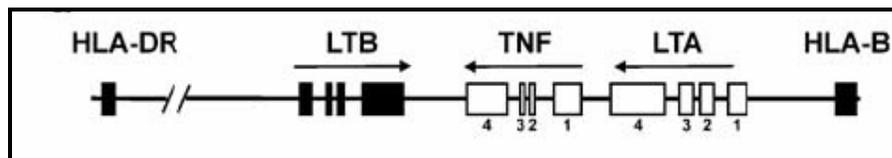


Figura 1: Representação esquemática do *loci TNFA* e *LTA* na região de classe III do MHC no cromossomo 6.

Nota: Modificado de PE Posch, I Cruz, D Bradshaw and BA Medhekar. *Novel polymorphisms and the definition of promoter 'alleles' of the tumor necrosis factor and lymphotoxin- α loci: inclusion in HLA haplotypes*. *Genes and Immunity* v. 4, p 547–558, 2003.

Pennica e col., após análise das seqüências de aminoácidos das citocinas $TNF\alpha$ e $LT\alpha$, concluíram que as mesmas são estruturalmente relacionadas e apresentam 50% de homologia. Acredita-se que as regiões conservadas sejam responsáveis pelas atividades citotóxicas compartilhadas por $TNF\alpha$ e $LT\alpha$, por meio da interação com um receptor comum expresso na superfície celular (Pennica, Nedwin *et al.*, 1984).

A $LT\alpha$ tem uma atividade biológica similar com $TNF\alpha$. O $TNF\alpha$ é a principal citocina mediadora de inflamação e tem numerosos efeitos na resposta imune no sentido de ativar e recrutar outras células inflamatórias, aumentar a produção de IL-1, IL-6 e IL-8 e ativar fatores de transcrição nuclear como NF- κ B, a fim de propagar e manter a resposta inflamatória (Blanco, Palucka *et al.*, 2008). Além disso, essa citocina possui uma importante função na regulação da apoptose através da ativação de receptores mediadores da apoptose em numerosos tipos celulares (Gupta e Gollapudi, 2006). O TNF é produzido por diferentes tipos celulares, entre

eles, os linfócitos T e B, queratinócitos, fibroblastos e macrófagos, as quais são responsáveis pela alteração de secreção de TNF α .

Recentemente, foi sugerido que um desequilíbrio de citocinas estaria influenciando no processo de despigmentação do vitiligo (Grimes, Morris *et al.*, 2004). Autores detectaram na pele de pacientes afetados por vitiligo um significativo aumento da expressão de TNF α comparado com pele de controles saudáveis (Moretti, Spallanzani *et al.*, 2002; Birol, Kisa *et al.*, 2006).

Tem sido sugerido que a morte dos melanócitos seja mediada por apoptose. Citocinas tais como IFN α e TNF α estariam iniciando esse processo de apoptose (Huang, Nordlund *et al.*, 2002). Além disso, o TNF α tem a capacidade de inibir a melanogênese através de um efeito inibitório na tirosinase e proteínas relacionadas à tirosinase (Martinez-Esparza, Jimenez-Cervantes *et al.*, 1998).

O polimorfismo de região promotora do gene *TNFA* (-308 G/A) está associado com uma alta taxa de transcrição do gene *TNFA* em estudos *in vitro*. O alelo -308A do gene *TNFA* está associado com o aumento da produção de citocinas comparado com o alelo -308G (Wilson, Di Giovine *et al.*, 1992). O polimorfismo -308 do gene *TNFA* está em desequilíbrio de ligação (LD) com HLA A1, B8, DR3 (Wilson, De Vries *et al.*, 1993). O alelo DR2 está associado com baixa produção de TNF α enquanto que os alelos DR3 e DR4 estão associados com alta produção de TNF α (Nicklas, Falta *et al.*, 1990). Conseqüentemente, o aumento da produção de TNF α poderia contribuir para o aumento de incidência do vitiligo observado em indivíduos com o haplótipo DR4 (Yazici, Erdal *et al.*, 2006). O polimorfismo na posição -308 do *TNFA* já foi associado com várias doenças, tais como: choque séptico (Mira, Cariou *et al.*, 1999), doença periodontal (Trombone, Cardoso *et al.*, 2008), diabetes tipo 1 (Shin, Yang *et al.*, 2008; Boraska, Zeggini *et al.*, 2009) e Lupus Eritematoso Sistêmico (Lee, Harley *et al.*, 2006).

O polimorfismo na posição +252 G/A do gene *LTA* encontra-se localizado no primeiro íntron deste gene e atua alterando o nível transcricional da LT α . Este polimorfismo do gene *LTA*, isoladamente, já foi associado ao infarto do miocárdio (Ozaki, Ohnishi *et al.*, 2002) e a doenças infecciosas como leishmaniose (Cabrera, Shaw *et al.*, 1995) e autoimunes, como LES (Lu, Cheng *et al.*, 2005).

1.5.2. *NALP1 - NACHT leucine-rich repeat protein 1*

O gene *NALP1* (também conhecido como *NLRP1*, *DEFCAP*, *NAC* e *CARD7*) está localizado no *locus* denominado de SLEV1 no cromossomo 17p13. Esse gene estrutura-se em 16 éxons e 15 íntrons compreendendo um segmento genômico de 292kb. O *NALP1* é expresso em altos níveis em células T e células de Langerhans, ressaltando o seu potencial papel na autoimunidade (Vogel, Nattermann *et al.*, 2006).

O NALP1 é um membro da família dos receptores tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domains*), proteínas citoplasmáticas identificadas recentemente que mediam a ativação do sistema imune inato (Magitta, Boe Wolff *et al.*, 2009). A proteína NALP1 tem estrutura complexa oligomérica, multidomínio e está envolvida na resposta celular a estímulos apoptóticos e inflamatórios. Esta proteína é composta pelos seguintes domínios: (i) PYD N-terminal (domínio de morte); (ii) NACHT: NAIP (proteína inibidora de apoptose neuronal), CIITA (ativador de transcrição do MHC classe II); HET-E (*locus* incompatibilidade da proteína de *Podospora anserina*); TP1 (proteína associada à telomerase); (iii) CARD (domínio de recrutamento de caspases); (iv) LRR (*leucine-rich repeat*) (Tschopp, Martinon *et al.*, 2003). NALP1 é o único entre os membros da família NALP que contém uma extensão C-terminal composta do domínio CARD, o qual interage e ativa a caspase-5.

A associação entre NALP1 e outras proteínas formam um complexo citoplasmático multiprotéico que media a ativação de caspases inflamatórias, as quais podem mais adiante ativar citocinas pró-inflamatórias e promover a inflamação. O NALP1 interage com ASC (em inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*) via domínio PYD e com caspase-5 via domínio C-terminal CARD. Estas proteínas juntas com a caspase-1 formam um complexo multiproteico chamado de inflamassomo. Este complexo é responsável por promover a ativação de citocinas inflamatórias, como por exemplo, a interleucina-1 β (IL-1 β) (Martinon, Burns *et al.*, 2002). A IL-1 β é produzida por macrófagos e monócitos e atua gerando uma resposta sistêmica e local à infecção e alterações no sistema imunológico. A IL-1 β é produzida como um precursor citoplasmático inativo e precisa ser clivada pela caspase-1 no inflamassomo para se transformar em sua forma ativa e promover a

inflamação. No soro de pacientes com vitiligo generalizado, os níveis de interleucina-1 β estão elevados comparados a indivíduos saudáveis (Tu, Gu *et al.*, 2003), sugerindo o envolvimento desta via na patogênese da doença.

Interessantemente, mutações encontradas em proteínas que contêm o domínio NACHT têm sido associadas com doenças inflamatórias crônicas. Por exemplo, mutações na seqüência codificadora de Nod2, proteína da família NACHT, estão associadas com a suscetibilidade à doença de Crohn e síndrome Blau (Miceli-Richard, Lesage *et al.*, 2001; Ogura, Bonen *et al.*, 2001). Mutações na seqüência codificadora do gene *NALP3*, um homólogo do *NALP1*, resultou em diversos fenótipos autoinflamatórios. Recentemente, o papel de variantes genéticas do gene *NALP1* no controle da suscetibilidade a doenças autoimunes e inflamatórias, como por exemplo, vitiligo (Jin, Mailloux *et al.*, 2007), doença de Addison e diabetes tipo 1 (Magitta, Boe Wolff *et al.*, 2009) tem sido investigado.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O vitiligo é um problema para a saúde e bem estar de milhões de pessoas. 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 melhores estratégias de diagnóstico e tratamento.

Embora promissores, estudos anteriores indicam uma natureza complexa do componente genético no controle da suscetibilidade ao vitiligo. Nossa hipótese é que polimorfismos dos genes *NALP1*, *TNFA* (previamente associados à ocorrência de vitiligo) e *LTA* estejam envolvidos no controle da suscetibilidade à doença em uma população sul-brasileira. A escolha desses genes é justificada pelo fato de: (i) recentemente, foi reportada evidência da existência de um *locus* de suscetibilidade ao vitiligo na região cromossômica 6p21-p22, que abriga os genes *TNFA* e *LTA*, em famílias de chineses com vitiligo generalizado (Liang, Yang *et al.*, 2007); nesta região, nenhum gene específico foi descrito e confirmado até agora, com exceção de alelos HLA; (ii) existe abundante evidência funcional de um papel destes três genes na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias, inclusive vitiligo; (iii) há a necessidade de replicar de forma independente à associação genética descrita em estudos anteriores para os genes *NALP1* e *TNFA*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi aplicar uma estratégia de análise de associação baseada em famílias para investigar a participação de polimorfismos dos genes candidatos *TNFA*, *LTA* e *NALP1* no controle da suscetibilidade ao vitiligo e suas variáveis clínicas, em uma população sul-brasileira.

3.2. Objetivos Específicos

- Testar os polimorfismos dos genes *TNFA*-308, *LTA*+252 e *NALP1* (rs2301582, rs12937224, rs6502867) para associação com suscetibilidade ao vitiligo em uma amostra populacional composta por trios formados por filhos afetados com vitiligo e seus pais, utilizando um desenho baseado em famílias;
- Estimar as OR relativas às variantes associadas ao controle do vitiligo na população estudada;
- Verificar a influência das variáveis: doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início do vitiligo, em caso de evidência de associação para os polimorfismos dos genes candidatos selecionados;
- Replicar os achados positivos originais, em uma amostra populacional independente, do tipo caso-controle, recrutada paralelamente à população de famílias.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho Geral do Estudo

O presente estudo é quantitativo, 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 uma análise primária de associação baseada em famílias, seguida de uma análise caso-controle visando à replicação dos resultados positivos. A figura 2 apresenta um fluxograma do desenho geral do estudo.

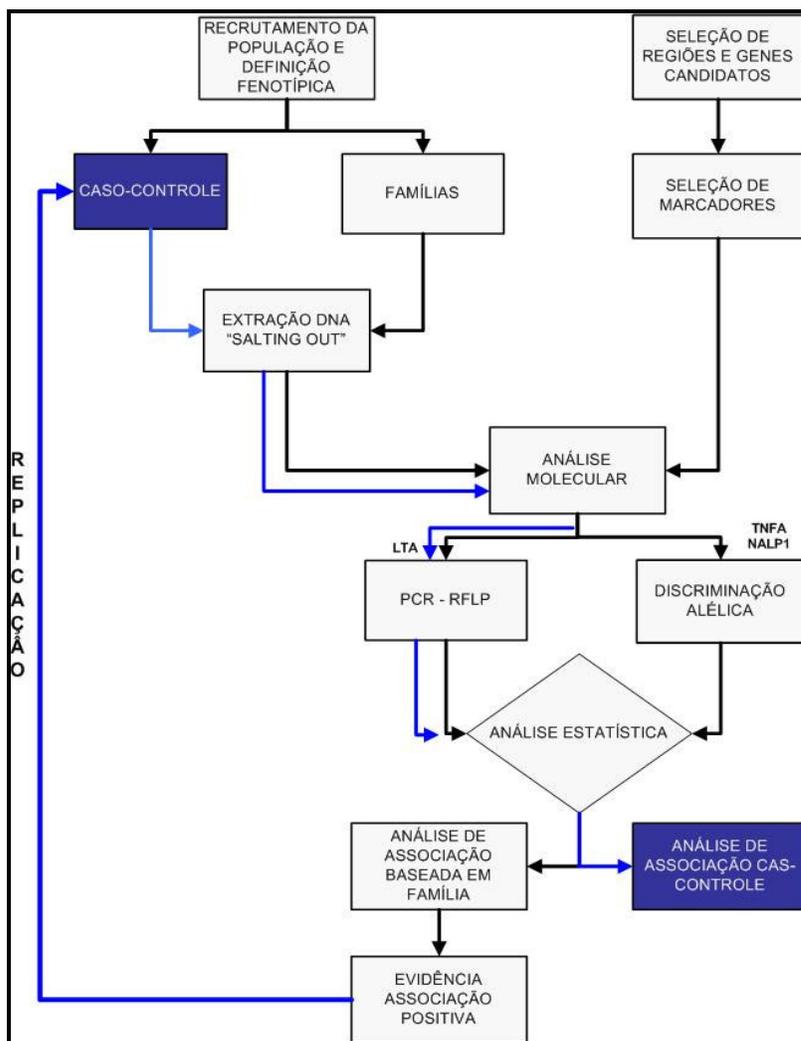


Figura 2: Desenho geral do estudo.

4.2. População Estudada

Este estudo foi realizado utilizando uma população 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 um 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 que emite luz ultravioleta "A" em ambiente escuro, a fim de diferenciar acromia (ausência de pigmento), encontrada no vitiligo, de hipocromia (pequena quantidade de pigmento) encontrada em outras doenças. Quando necessário, a confirmação da presença do vitiligo foi obtida através de biópsia e exame histopatológico. Após o diagnóstico, todos os casos confirmados responderam a um questionário para informar dados demográficos e clínicos como: sexo, idade de início do vitiligo (auto-relato 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).

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 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.

4.2.1. População de Famílias

Para a análise de associação baseada em famílias, foram incluídos neste estudo 632 indivíduos distribuídos em 199 famílias nucleares formadas por indivíduos afetados com vitiligo, independente de sua forma clínica, seus pais e familiares, quando disponível. Essas famílias foram divididas em 171 famílias *simplex* independentes (formado por um indivíduo afetado e seus pais) e 28 famílias *multiplex* (formadas por dois ou mais membros afetados). Ao todo, 224 trios puderam ser derivados desta amostra populacional.

4.2.2. População Caso-controle

Para compor a população caso-controle de replicação, foram recrutados, paralelamente à população de famílias outros 121 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 (casos 39 anos e controles 41 anos; $p = 0,30$) e sexo, provenientes da mesma região geográfica. Critérios de elegibilidade para o grupo controle foram: ausência de auto-relato de história pessoal ou familiar de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, bem como ausência de sinais de vitiligo após completo exame físico realizado por médico dermatologista experiente.

Na tabela 2 estão descritas as principais características demográficas e clínicas dos 224 indivíduos afetados com vitiligo recrutados para o estudo baseado em famílias e dos 121 indivíduos que compõem o grupo de casos para o estudo caso-controle. As doenças autoimunes associadas com vitiligo presentes na população estudada são: doença autoimune da tireóide, artrite reumatoide, diabetes tipo 1, psoríase, lupus eritematoso sistêmico, halo-nevus, alopecia areata e esclerodermia cutânea.

Tabela 2: Características demográficas e clínicas dos indivíduos afetados com vitiligo na população estudada.

CARACTERÍSTICAS	BASEADO EM FAMÍLIA N= 224	CASO-CONTROLE N=121	P-VALOR
Gênero n (%)			
Masculino	92 (41,1%)	51 (42,2%)	0,7
Feminino	132 (58,9%)	70 (57,8%)	
Idade de Início do Vitiligo Média (anos)	18,1 ± 11,47	25 ± 15,94	0,0001
Doenças Autoimune n (%)			
Presença	108 (48,2%)	50 (41,3%)	0,29
Ausência	115 (51,3%)	63 (52,1%)	
Dados não disponíveis	1 (0,5%)	8 (6,6%)	
Forma clínica n (%)			
Segmentar	40 (17,8%)	14 (11,6%)	0,04
Não-Segmentar	184 (82,2%)	107 (88,4%)	
- Localizado	19 (8,5%)	7 (5,8%)	
- Generalizado	112 (50%)	68 (56,2%)	
- Acrofacial	51 (22,8%)	31 (25,6%)	
- Universal	2 (0,9%)	1 (0,8%)	

Nota: Dados clínicos e epidemiológicos detalhados da população recrutada compõem resultado do relatório de passagem de Mestrado para Doutorado previamente defendido no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pelo mestrando Caio C. S. Castro.

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 como uma das 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. 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 vacutainer® 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 (John, Weitzner *et al.*, 1991). 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 ressuspendido 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 a uma 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.

4.4. Análise Molecular

A genotipagem do polimorfismo na posição +252 (rs909253) no intron 1 do gene *LTA* foi realizada através do sistema de PCR-RFLP (do inglês *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). O polimorfismo da região promotora do gene *TNFA* na posição -308 (rs1800629) e os Tag SNPs rs2301582 (intron 15), rs12937224 (intron 14) e rs6502867 (éxon 11) do gene *NALP1* foram genotipados através do sistema de discriminação alélica ABITaqMan conforme implementado na plataforma 7500 de PCR em tempo real.

4.4.1. Genotipagem do polimorfismo +252 do gene *LTA* - Amplificação por PCR

A região genômica contendo o marcador genético para o gene *LTA* foi amplificada por PCR. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo *Veriti 96 Well Thermal Cycler Applied Biosystems*, sob condições uniformes. Os oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizados, bem como o tamanho do fragmento gerado encontram-se discriminados no quadro 2. As reações foram

realizadas em um volume final de 25 µL contendo tampão para Taq DNA polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.3 µM de cada oligonucleotídeo e 1.0 U de Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) e 40 ng de DNA.

Após as reações de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 0,045 M, EDTA 1 mM) para verificar a eficiência da amplificação. Foram aplicados 10 µL do produto amplificado, homogeneizados em 2 µL de tampão de corrida (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol 0,25%). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel a 100 V durante aproximadamente 40 minutos utilizando marcador de massa molecular 123 bp (Invitrogen). Em seguida, o material genético foi corado através da imersão do gel em solução de brometo de etídio 0,1 µg/mL. As bandas foram visualizadas em transiluminador e fotografadas em sistema de fotodocumentação digital Geliance 200 Imaging System da Perkin Elmer e Kodak EDAS 290.

SNP	Oligonucleotídeos (orientação 5'-3')	Ciclagem	Tamanho do Fragmento
<i>LTA</i> +252	Sense	95°C - 3 min	782 pb
	CCGTGCTTCGTGTTTGGACTA	95°C - 45 seg	
		62°C - 45 seg	
	Antisense	72°C - 1'30"	
	AGAGGGGTGGATGCTTGGGTTC	72°C - 5 min	

Quadro 2 - Oligonucleotídeos e condições de ciclagem usados e tamanho do fragmento gerado na PCR para amplificação da sequência contendo o polimorfismo +252 do gene *LTA*.

4.4.2. Genotipagem do polimorfismo +252 do gene *LTA* – Análise por PCR-RFLP

A técnica de RFLP baseia-se na detecção de variantes genéticas com base no resultado obtido pela digestão do amplicom de DNA contendo a variação em análise por enzimas de restrição. Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição específica, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A separação destes fragmentos por eletroforese permite a distinção dos diferentes genótipos.

Para a genotipagem do SNP *LTA*+252, procedeu-se a digestão dos fragmentos amplificados com a enzima de restrição NcoI (New England – BioLabs

Ipswich, MA), através de protocolo indicado pelo fabricante. Brevemente, duas unidades de enzima foram adicionadas a 15 uL de produto de PCR para um volume final de 20 uL. O sistema foi incubado por 15 horas a 37°C e os produtos da digestão foram separados por eletroforese a 90 V por 1 hora e 30 minutos em gel de agarose a 3%. A genotipagem foi realizada de acordo com o padrão de bandas observado após a reação, conforme ilustrado na figura 3 e descrito no quadro 3. O padrão de bandas resultante da digestão dos fragmentos foi visualizado em transiluminador após coloração com brometo de etídio, como descrito anteriormente.

SNP	Reação da digestão (37°C, 15 horas)	Fragmentos observados após a reação de digestão e genótipos correspondentes
LTA +252	NcoI 2U (5'-C'CATGG-3'-NEB)	AA: 1 fragmento (782 pb)
	Tampão 4 (NEB) - 1 X	AG: 3 fragmentos (782, 586 e 196 pb)
	Produto amplificado - 15µL	GG: 2 fragmentos (586 e 196 pb)
	H ₂ O - Suficiente para 20µL	

Quadro 3- Reação de digestão do polimorfismo do gene LTA com enzima de restrição NcoI-NEB e tamanho dos fragmentos observados. Legenda: 2U= duas unidades; NEB = New England Biolab; pb= pares de bases

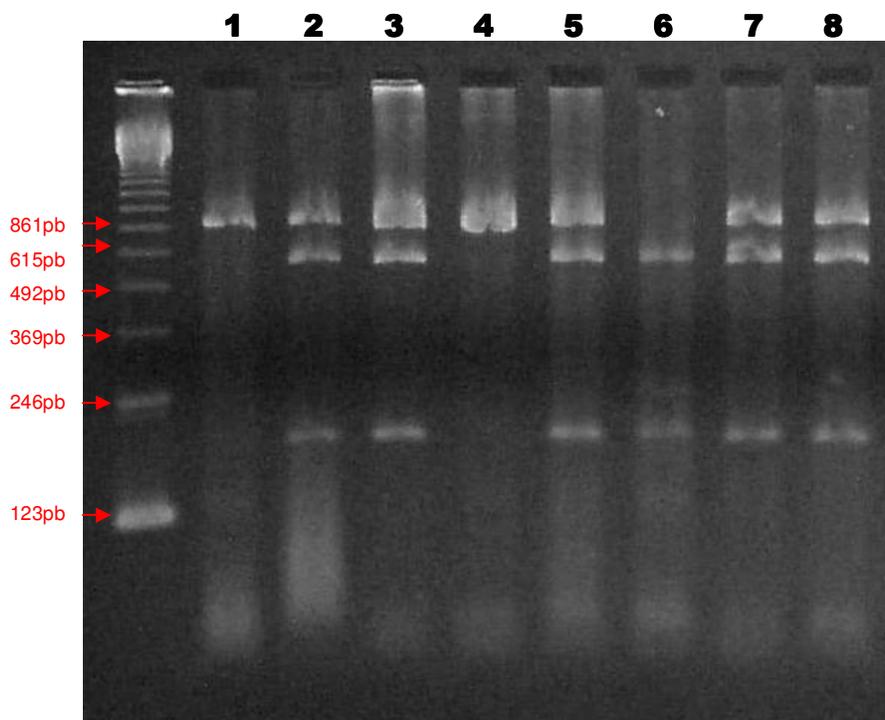


Figura 3: Padrão de bandas após digestão com enzima de restrição NcoI-NEB dos amplicons contendo o polimorfismo +252 do gene LTA. Os padrões de bandas observados para os n°1 e 4, homozigotos para o alelo A, n°2, 3, 5, 7 e 8 heterozigotos e n°6 homozigoto para o alelo G.

4.4.3. Genotipagem dos polimorfismos dos genes *TNFA* e *NALP1* - Discriminação Alélica

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 VICTM e FAMTM) 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*.

A genotipagem do polimorfismo -308 do gene *TNFA* foi realizada através do sistema TaqMan de discriminação alélica do tipo *Assay by Design* (Applied Biosystems), em colaboração com o Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz-RJ. Para os Tag SNPs do gene *NALP1*, a genotipagem foi realizada usando o sistema TaqMan de discriminação alélica do tipo *Genotyping Assays* (Applied Biosystems). No quadro 4 estão descritas as informações para cada marcador.

GENE	MARCADOR	TIPO PRODUTO	IDENTIFICAÇÃO ENSAIO	SNP [ALELO 1/ALELO 2]	FLUORÓFORO
<i>NALP1</i>	rs 6502867	TaqMan® Genotyping Assays	C_29222211_20	[G/A]	[VIC/FAM]
<i>NALP1</i>	rs12937224	TaqMan® Genotyping Assays	C_31558203_10	[G/A]	[VIC/FAM]
<i>NALP1</i>	rs2301582	TaqMan® Genotyping Assays	C_15756454_10	[C/T]	[VIC/FAM]
<i>TNF-308</i>	rs1800629	Custom TaqMan® Assay by design	TNFPROM-308	[G/A]	[VIC/FAM]

Quadro 4- Identificação dos marcadores e alelos polimórficos para os genes *NALP1* e *TNFA*

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 VICTM e FAMTM 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 min, 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 min 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 (figura 4).

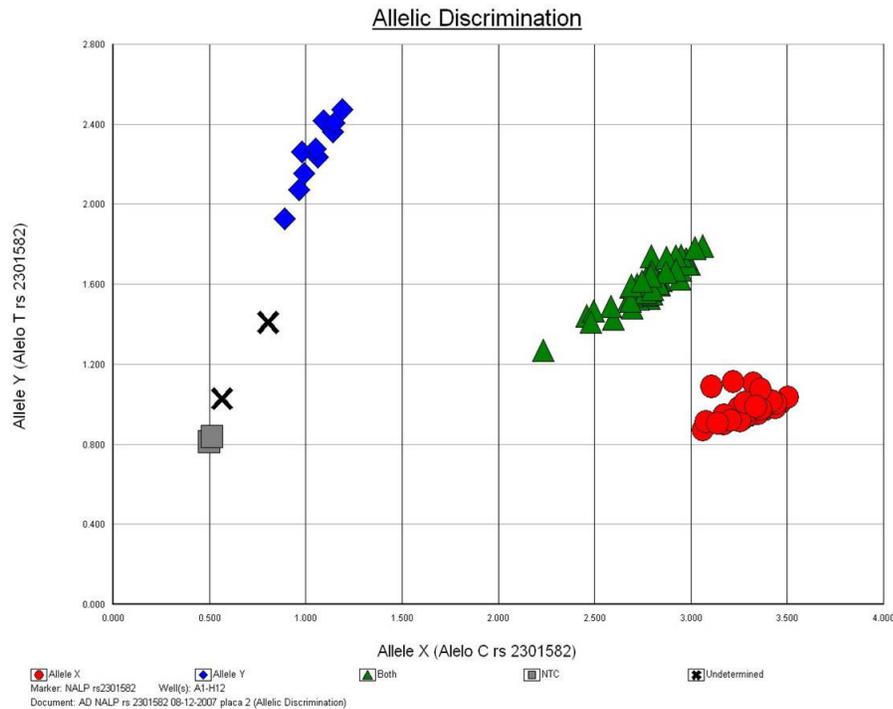


Figura 4: Padrão dos *clusters* alelo-específicos discriminados de acordo com a intensidade de fluorescência detectada no comprimento de onda dos fluoróforos VIC™ e FAM™.

4.5. 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), conforme implementado no software FBAT (Horvath, Xu *et al.*, 2001). A análise considera pais heterozigotos e avalia a frequência com as quais os alelos são transmitidos dos pais heterozigotos para os filhos afetados. Assim, só são incluídas na análise famílias apresentando pelo menos um dos pais heterozigotos para o marcador em estudo. As frequências alélicas na população foram estimadas com base nos alelos parentais não-transmitidos (Thomson e Esposito, 1999). Os alelos dos marcadores dos genes candidatos mostrando evidência para associação foram analisados novamente por regressão logística condicional, estratégia que permite analisar a influência dos fatores ambientais juntamente aos fatores genéticos, assim como estimar o “odds ratio” (OR) e os intervalos de confiança, utilizando o comando PHREG, conforme implementado no software SAS, versão 9.1

(SAS institute, Cary, North Carolina, USA). A análise de associação genética baseada em população (caso-controle) também foi implementada no programa SAS, utilizando o comando LOGISTIC.

Os testes realizados para verificar se as frequências alélicas dos SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e o grau de LD entre alelos de pares de marcadores usando o parâmetro r^2 , foram estimados utilizando o software Haploview.

5. RESULTADOS

5.1. Análise de associação baseado em famílias

5.1.1. *NALP1* (*NACHT leucine-rich-repeat protein 1*)

5.1.1.1. Análise de associação do gene *NALP1* com vitiligo *per se*

Foram testados três SNPs intragênicos no gene *NALP1* para associação com vitiligo *per se*. Análise de LD entre os três marcadores mostrou o rs6502867 como um tag SNP *singleton*, enquanto que os SNPs rs12937224 e rs2301582 estavam em LD ($r^2 = 0,82$). A frequência alélica do SNP rs2301582 desviou significativamente ($p = 0,006$) do equilíbrio de Hardy-Weinberg e foi excluído das análises.

Foi encontrada evidência de associação entre vitiligo *per se* e o alelo “A” do marcador rs6502867 do gene *NALP1* nas famílias estudadas, na análise de TDT clássica ($p = 0,04$) e confirmada na análise de regressão logística condicionada ($p = 0,03$) (tabela 3).

Tabela 3: Análise de associação dos SNPs do gene *NALP1* com vitiligo *per se*

	<i>NALP1</i> rs2301582	<i>NALP1</i> rs12937224	<i>NALP1</i> rs6502867
Estrutura do BIN			
Alelo de Risco	C	A	A
Frequência Alélica	0,65	0,56	0,76
N° Famílias Informativas	60	77	28
FBAT (P - valor)	NS	NS	0,04*
Univariada			
OR (95% CI)	-	NS	3,01 (1,09 - 8,31)
P - valor			0,03*

BIN, marcadores em desequilíbrio de ligação ($r^2 > 0,8$). OR, Taxa de Risco.

CI Intervalo de Confiança. NS, Não significativo.

*Modelo dominante

5.1.1.2. Análise haplotípica entre marcadores do gene *NALP1*

Análise haplotípica envolvendo os SNPs rs12937224 e rs6502867 do gene *NALP1* com vitiligo revelou evidência de associação entre a doença e o haplótipo formado entre o alelo “A” do marcador rs12937224 e o alelo “G” do marcador rs6502867 ($p = 0,03$), sendo este haplótipo subtransmitido em nossa população, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4: Haplótipo entre marcadores do gene *NALP1*

HAPLÓTIPO		FREQUÊNCIA HAPLÓTIPO	Nº DE FAMILIAS INFORMATIVAS	Z	FBAT (P-VALOR)*
<i>NALP1</i> rs12937224	<i>NALP1</i> rs6502867				
A	A	0,38	58	1,01	0,31
G	A	0,37	47	-0,82	0,4
A	G	0,18	14	-2,07	0,03
G	G	0,06	1	-	-

FBAT, Teste de Associação Baseado em Famílias. Z, Teste Z.

*Modelo Recessivo

5.1.1.3. Análise do marcador rs6502867 do gene *NALP1* estratificado por forma clínica, idade e doenças autoimunes associadas.

Com a finalidade de verificar a influência das variáveis: forma clínica, idade de início da doença e presença de doenças autoimunes associadas sobre o efeito de associação encontrado para o marcador rs6502867 do gene *NALP1*, a população estudada foi estratificada nestas variáveis, conforme mostrado na tabela 5.

Ao estratificar a população verificamos que o efeito observado para o marcador rs6502867 do gene *NALP1* não se distribuiu de forma homogênea entre o sub-grupo presença/ausência de doenças autoimunes associadas e idade inferior a 25 anos/superior a 25 anos: Evidência para associação com esse SNP só se manteve no sub-grupo sem doenças autoimunes associadas, e entre os casos de vitiligo de aparecimento precoce (tabela 5). O tipo clínico da doença, estratificado

entre segmentar e não-segmentar, não teve impacto sobre a associação encontrada para o SNP rs6502867.

Tabela 5: Análise de regressão logística condicionada do rs6502867 do gene *NALP1* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

VARIÁVEIS	n	REGRESSÃO LOGÍSTICA CONDICIONADA (P-VALOR)*	ODDS RATIO (95% CI)
DOENÇAS AUTOIMUNE**			
PRESENÇA	108	0,54	1,5 (0,40 - 5,63)
AUSÊNCIA	115	0,04	8,49 (1,03 - 69,70)
TIPO CLÍNICO			
SEGMENTAR	40	-	-
NÃO-SEGMENTAR	184	0,1	2,4 (0,84 - 6,82)
IDADE DE INÍCIO			
< 25 ANOS	172	0,06	3,17 (0,93 - 10,86)
> 25 ANOS	62	0,31	3 (0,34 - 25,95)

CI, Intervalo de Confiança. n, número de famílias da população em cada sub-grupo.

*Modelo dominante

** Sem informação de 1 família

5.1.2. *LTA* (Linfotoxina Alfa)

5.1.2.1. Análise de associação do polimorfismo +252 do gene *LTA* com vitiligo *per se*

A frequência alélica do polimorfismo na posição +252 do gene *LTA* estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Análise de regressão logística condicionada revelou evidência de associação entre vitiligo *per se* e o alelo "A" do polimorfismo + 252 do gene *LTA* na população estudada ($p = 0,04$), com valor de OR indicativo de suscetibilidade (tabela 6).

Tabela 6: Análise de associação do polimorfismo +252 do gene *LTA* com vitiligo *per se*

SNP	FREQUÊNCIA ALÉLICA	NºFAMILIAS INFORMATIVAS	FBAT (P-VALOR)	REGRESSÃO LOGÍSTICA CONDICIONADA (P-VALOR)	ODDS RATIO (95% CI)
<i>LTA</i> +252*	-	124	0,71	0,59	0,92 (0,68 - 1,24)
<i>LTA</i> +252/A**	0,64	57	0,06	0,04	1,95 (1,01 - 3,76)
<i>LTA</i> +252/G**	0,36	112	0,44	0,47	1,15 (0,77 - 1,72)

CI, Intervalo de Confiança; FBAT, Teste de Associação Baseado em Família; SNP, Polimorfismo de Base Única;

* Modelo aditivo

** Modelo dominante

5.1.2.2. Análise do polimorfismo +252 do gene *LTA* estratificada por forma clínica, idade e doenças autoimunes associadas

Com a finalidade de verificar a influência das variáveis: forma clínica, idade de início da doença e presença de doenças autoimunes associadas sobre a evidência de associação encontrada para o polimorfismo na posição +252 do gene *LTA*, a população estudada foi estratificada nestas variáveis, conforme mostrado na tabela 7 abaixo.

Ao estratificar a população verificamos que o efeito observado para o polimorfismo +252 do gene *LTA* não se distribuiu de forma homogênea entre os sub-grupos tipo clínico segmentar/não-segmentar e idade inferior a 25 anos/superior a 25 anos: Evidência para associação para esse polimorfismo só se manteve no sub-grupo tipo clínico não-segmentar e entre os casos de vitiligo de aparecimento precoce ($p = 0,04$). A presença ou ausência de doenças autoimunes associadas, não teve impacto sobre a associação encontrada para o polimorfismo +252 do gene *LTA*.

Tabela 7: Análise de regressão logística condicionada do polimorfismo +252 do gene *LTA* estratificado por doenças autoimunes associadas, forma clínica e idade de início da doença.

VARIÁVEIS	n	REGRESSÃO LOGÍSTICA CONDICIONADA (P-VALOR)*	ODDS RATIO (95% CI)
DOENÇAS AUTOIMUNE**			
PRESENÇA	108	0,09	2,33 (0,85 - 6,39)
AUSÊNCIA	115	0,24	1,67 (0,70 - 4,00)
TIPO CLÍNICO			
SEGMENTAR	40	0,69	1,38 (0,26 - 7,16)
NÃO-SEGMENTAR	184	0,04	2,04 (1,01 - 4,15)
IDADE DE INÍCIO			
INF. 25 ANOS	162	0,04	2,15 (1,10 - 4,49)
SUP. 25 ANOS	62	0,64	1,36 (0,36 - 5,09)

CI, Intervalo de Confiança; n, número de famílias da população em cada sub-grupo.

*Modelo dominante

** Sem informação de 1 família

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

5.1.3.1. Análise de associação do polimorfismo -308 do gene *TNFA* com vitiligo *per se*

A frequência alélica do polimorfismo na região promotora -308 do gene *TNFA* estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foi encontrada evidência de associação entre vitiligo *per se* e os alelos do gene *TNFA*-308 na população sul brasileira sob ambos os modelos aditivo e dominante (tabela 8).

Tabela 8: Análise de associação do polimorfismo -308 do gene *TNFA* com vitiligo *per se*

SNP	FREQUÊNCIA ALÉLICA	NºFAMILIAS INFORMATIVAS	FBAT (P-VALOR)	REGRESSÃO LOGÍSTICA CONDICIONADA (P-VALOR)	ODDS RATIO (95% CI)
<i>TNFA</i> -308*	-	81	0,5	1	-
<i>TNFA</i> -308/A**	0,15	78	1	0,54	0,75 (0,30 - 1,87)
<i>TNFA</i> -308/G**	0,85	21	0,09	0,77	0,93 (0,59 - 1,47)

CI, Intervalo de Confiança; FBAT, Teste de Associação Baseado em Família; SNP, Polimorfismo de Base Única.

* Modelo aditivo

** Modelo dominante

5.1.4. Análise haplotípica entre os polimorfismos gênicos *LTA*+252 e *TNFA*-308

Análise haplotípica envolvendo os polimorfismos nas posições +252 do gene *LTA* e -308 do gene *TNFA* com vitiligo revelou evidência de associação entre a doença e o haplótipo formado entre o alelo “G” do gene *LTA*+252 e o alelo “G” do gene *TNFA*-308 ($p = 0,03$), sendo este haplótipo sub-transmitido na amostra populacional em análise (tabela 9).

Tabela 9: Haplótipo entre os polimorfismos gênicos *LTA*+252 e *TNFA*-308

HAPLÓTIPO		FREQUÊNCIA HAPLÓTIPO	Nº DE FAMILIAS INFORMATIVAS	Z	FBAT (P-VALOR)*
<i>LTA</i> +252	<i>TNFA</i> -308				
G	A	0,61	85	-0,73	0,46
G	G	0,23	30	-2,06	0,03
A	G	0,12	9	-	-
A	A	0,02	0	-	-

FBAT, Teste de Associação Baseado em Família; Z, Teste Z

*Modelo recessivo

5.2. Análise de associação caso-controle - replicação

5.2.1. Análise de associação do polimorfismo +252 do gene *LTA* com vitiligo *per se*

Como o achado de associação para o polimorfismo +252 do gene *LTA* é inédito, houve a necessidade de testá-lo para replicação na população caso-controle. Foi encontrada evidência marginal de associação genotípica entre o polimorfismo +252 do gene *LTA* e vitiligo *per se* ($p = 0,06$) nesta amostra populacional independente (tabela 10). A frequência alélica do polimorfismo na posição +252 do gene *LTA* estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 10: Análise caso-controle do polimorfismo +252 do gene *LTA*

		CASO	CONTROLE	X ²	P - VALOR**	ODDS RATIO (95% CI)
FREQUENCIA GENOTÍPICA	AA/AG	109 (90,08%)	120 (96%)	3,34*	0,06*	0,37 (0,12 - 1,10)
	GG	12 (9,92%)	5 (4%)			
FREQUENCIA ALÉLICA	A	171 (70,66%)	183 (73,20%)	0,39	0,53	0,88 (0,59 - 1,30)

X², Qui-Quadrado Pearson; CI, Intervalo de Confiança.

*X² Fisher

** Modelo dominante

6. DISCUSSÃO

O vitiligo pode ser considerado uma doença genética complexa, ou seja, seu controle não exibe um padrão de herança mendeliano clássico: 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 (Lander e Schork, 1994). As doenças genéticas complexas possuem algumas características, que as diferenciam das doenças mendelianas clássicas, tais como: (i) a doença varia na severidade dos sintomas e idade de início, o que resulta em dificuldades na definição do fenótipo apropriado e seleção da melhor população para estudo; (ii) a doença pode variar em seu mecanismo etiológico envolvendo várias vias biológicas; (iii) doenças genéticas complexas são frequentemente oligogênicas ou mesmo poligênicas, onde cada gene contribui com uma fração do risco relativo total (Tabor, Risch *et al.*, 2002).

A questão central na fisiopatologia do vitiligo é: a ausência de melanócitos na pele (Le Poole, Van Den Wijngaard *et al.*, 1993) é devido a uma destruição *in situ* ou a uma perda de células íntegras, como por exemplo, devido a um defeito de adesão? Tentativas de se explicar o mecanismo celular que leva ao aparecimento das máculas brancas na pele levou a diferentes teorias tais como: um processo apoptótico devido a um desequilíbrio nos níveis de Bax e Bcl2 (Van Den Wijngaard, Wankowicz-Kalinska *et al.*, 2000); um evento necrótico associado com processo inflamatório; dano na função de adesão célula-célula ou célula-matriz (Gauthier, Cario Andre *et al.*, 2003); além das hipóteses da autoimunidade, autocitotoxicidade e neural descritas anteriormente. Esses dados sugerem uma heterogeneidade na patogênese da doença que seria responsável por diferentes fenótipos clínicos, o que é reforçado por estudos de genética epidemiológica: Análise de Segregação Complexa encontrou um modelo aditivo poligênico o que melhor explica o conjunto formado por vitiligo segmentar, localizado, acrofacial e generalizado; porém, para o vitiligo universal, o melhor modelo foi o ambiental (Zhang, Liu *et al.*, 2004). Assim, é possível que o que nomeamos como “vitiligo” seja, na verdade, um conjunto de doenças que compartilham o mesmo fenótipo, mas que tem bases fisiopatológicas e moleculares distintas, dificultando sua caracterização.

Variáveis clínicas podem refletir diferentes mecanismos de instalação e progressão da doença, inclusive, aquele que envolve um possível efeito genético, tais como: (i) doença autoimune: várias doenças autoimunes têm sido associadas a variantes genéticas. Existem evidências de que a presença ou ausência de doenças autoimunes na família do indivíduo afetado por vitiligo tem alto impacto sobre o resultado de análise genética (Spritz, Gowan *et al.*, 2004), sugerindo que uma estratificação da população estudada por ocorrência de doença autoimune pode ser tão ou mais eficiente que estratificação por forma clínica; (ii) idade de início da doença: no vitiligo, idade de início precoce tem sido associada à ocorrência familiar de vitiligo generalizado (Laberge, Mailloux *et al.*, 2005). 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. Sendo assim, com a finalidade de estudar vitiligo e suas manifestações clínicas que podem interferir no fenótipo clínico da doença, as análises estatísticas realizadas para os polimorfismos dos genes candidatos selecionados neste estudo levaram em consideração a estratificação da população por presença ou não de doenças autoimune familiar, idade de início do vitiligo (acima e abaixo dos 25 anos) e forma clínica do vitiligo (segmentar e não-segmentar).

Com o advento de informações sobre a seqüência de genes ao longo do genoma humano, se tornou primordial desvendar a natureza dos fatores genéticos que influenciam na manifestação da doença. Estudos de genética epidemiológica realizados com casos de vitiligo sugerem que a patogênese da doença envolve a existência substancial de um componente genético de suscetibilidade; no entanto, a concordância de vitiligo entre gêmeos monozigóticos de 23% (Alkhateeb, Fain *et al.*, 2003) indica que a patogênese do vitiligo também envolve um componente não-genético, de natureza ainda desconhecida.

Análise de ligação, em populações com *backgrounds* étnicos diferentes, usando vitiligo generalizado como fenótipo, mostrou que o principal *locus* de suscetibilidade co-segregando com a doença em cada população não é o mesmo. Isso sugere que diferentes genes podem estar envolvidos na patogênese do vitiligo em diferentes populações ao redor do mundo, caracterizando uma doença poligênica (Spritz, Gowan *et al.*, 2004; Chen, Huang *et al.*, 2005; Liang, Yang *et al.*,

2007). Em geral, os sinais de ligação já detectados para o vitiligo não parecem corresponder à localização cromossomal dos vários genes candidatos estudados para a doença. Como a análise de ligação genética pode somente detectar *loci* com efeitos principais, esses genes candidatos podem ter apenas um efeito modesto na suscetibilidade ao vitiligo. Nessa abordagem, estudos de associação são ferramentas mais efetivas do que estudo de ligação para estudar doenças complexas, pois estes estudos têm um poder estatístico maior para detectar diversos genes de efeito pequeno a moderado (Tabor, Risch *et al.*, 2002).

Apesar de estudos prévios terem identificado *loci* de suscetibilidade ao vitiligo, são poucos os que foram seguidos da identificação de um gene candidato posicional (Nath, Kelly *et al.*, 2001; Jin, Mailloux *et al.*, 2007). Diversos genes candidatos funcionais (Jin, Park, Li, Lee, Hong, Hong *et al.*, 2004; Jin, Park, Li, Lee, Hong, Park *et al.*, 2004; Onay, Pehlivan *et al.*, 2007) têm sido propostos para o vitiligo, no entanto, a interpretação dos resultados da maioria desses estudos tem sido freqüentemente dificultada pelo número reduzido de pacientes estudados e, na grande maioria, ausência de replicação em diferentes populações. Atualmente é amplamente aceito entre geneticistas que achados originais de associação entre marcadores genéticos e fenótipos complexos precisam ser validados por replicação em estudos independentes, de preferência envolvendo populações de *background* étnico distintos da original. Nessa perspectiva, o desenho deste estudo visou replicar achados de associação de genes candidatos que participam da resposta imunológica, considerando que o vitiligo seja causado por interação de fatores ambientais ainda desconhecidos e fatores genéticos que contribuem para a destruição autoimune dos melanócitos (Laberge, Bennett *et al.*, 2008).

6.1. *NALP1* (*NACHT leucine-rich-repeat protein 1*)

De todos os genes candidatos já propostos para o controle da suscetibilidade ao vitiligo, o *NALP1* é o que tem sido mais consistentemente associado à doença. O sinal de ligação entre vitiligo e o *locus* 17p13 detectado em famílias com vitiligo associado a doenças autoimunes, coincidiu com a localização do *locus* SLEV1, sinal original de ligação detectado em famílias *multiplex* com LES e pelo menos um caso

de vitiligo (Nath, Kelly *et al.*, 2001). Estudos subseqüentes usando marcadores na região 17p13 resultaram na identificação do gene *NALP1* como um gene de suscetibilidade para vitiligo generalizado e para outras doenças autoimunes associadas a sua ocorrência (Jin, Mailloux *et al.*, 2007). Associação genética entre *NALP1* e vitiligo foi então confirmada em um estudo independente caso-controle de pacientes com vitiligo generalizado provenientes da Romênia (Jin, Birlea *et al.*, 2007).

Nosso estudo mostra que a variante rs6502867 (G/A) do gene *NALP1* confere suscetibilidade ao vitiligo *per se* nas famílias sul-brasileiras estudadas. É importante ressaltar que dos três SNPs testados no gene *NALP1*, a associação observada para o rs6502867 por nosso grupo, em um modelo dominante, é para o mesmo SNP e na mesma direção (o mesmo alelo de risco) que o descrito anteriormente em modelo aditivo (Jin, Mailloux *et al.*, 2007), em um paralelo perfeito entre as populações do Brasil, USA e Romênia.

O haplótipo construído entre os alelos de riscos dos SNPs rs6502867 e rs12937224 não mostrou associação com a doença; já o haplótipo formado pelo alelo “A” do marcador rs12937224 e o alelo “G” do marcador rs6502867 mostrou um efeito de proteção em nossa população. No entanto, o real significado deste achado é limitado pelo baixo número de famílias (14) apresentando este haplótipo.

Ao estratificar a população por forma clínica, idade de início da doença e presença de doenças autoimune, verificamos que a evidência de associação concentra-se no sub-grupo dos indivíduos afetados com vitiligo sem doença autoimune familiar associada. Entre as evidências para a origem autoimune do vitiligo está sua associação epidemiológica com outras doenças autoimunes. Cerca de 30% de pacientes com vitiligo generalizado são afetados por pelo menos uma doença autoimune adicional. Descrição de uma população composta por pacientes com vitiligo recrutados nos Estados Unidos e Reino Unido revelou que 19% dos indivíduos caucasianos adultos com a doença apresentam também tireodite de Hashimoto. Anemia perniciosa também foi freqüente, ocorrendo em 1,9% dos probandos adultos. Já a doença de Addison, o lupus eritematoso sistêmico e a doença de Crohn são incomuns, porém ocorrem em uma freqüência aumentada nos probandos de vitiligo (Alkhateeb, Fain *et al.*, 2003). Tem sido postulado que essas doenças compartilham um fator de suscetibilidade genético comum. Nossos achados

não confirmam que o SNP rs6502867 do gene *NALP1* confere risco a vitiligo associado concomitantemente a doenças autoimunes, conforme descrito por Jin e col. (Jin, Mailloux *et al.*, 2007). Nosso estudo revelou que a associação só se manteve no subgrupo sem doença autoimune associada. No entanto, este dado deve ser interpretado com cautela devido ao intervalo de confiança obtido (OR = 8,49; 95% CI 1,03 – 69,70). Além disso, é importante mostrar que existe diferença na natureza e proporção das doenças autoimunes associadas ao vitiligo entre as populações estudadas. Na nossa população, além das doenças autoimunes descritas no trabalho anterior (Jin, Mailloux *et al.*, 2007), foram ainda observadas às doenças halo-nevus, alopecia areata e esclerodermia cutânea.

Concentração do sinal de associação também foi observado com significância marginal, no sub-grupo de casos de vitiligo de aparecimento precoce – porém, o número pequeno de famílias com casos de vitiligo após os 25 anos, novamente, limita a interpretação deste achado.

O SNP rs6502867 está localizado no íntron 15 do *NALP1*, portanto, o impacto funcional desta variação é desconhecido. Além disso, esta variante não está em LD com nenhum SNP funcional previamente descrito. 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 (Lin, Miller *et al.*, 2006; Lin e Ying, 2006). Pode-se assim, especular sobre um possível impacto das variações intrônicas como o rs6502867 sobre a atividade regulatória destas moléculas de RNA. Além disso, é sempre possível que a variação afete os níveis de expressão ou a estabilidade do mRNA do gene. Finalmente, é possível que esta variação esteja em LD com a variação causal, ainda desconhecida.

NALP1 é um regulador chave do sistema imune inato e pertence à família de proteína citoplasmática responsável por resposta celular à apoptose e estímulos inflamatórios. Apesar de Taïeb (Taieb, 2007) questionar o papel do gene *NALP1* na patogênese do vitiligo, argumentando o fato de que biópsias de lesões de vitiligo apresentam apenas inflamação escassa. Outros autores porém relatam evidências de uma marginal infiltração de células T nessas lesões (Van Den Wijngaard, Wankowicz-Kalinska *et al.*, 2000). É importante ressaltar que o *NALP1* é uma

proteína com multidomínios e apresenta um papel na apoptose celular, através do recrutamento de caspase-2 e caspase-9 para o complexo chamado de apoptosomo. A superexpressão do *NALP1* estimula apoptose mediada por caspase em uma variedade de tipos celulares (Chu, Pio *et al.*, 2001; Zhang, Liu *et al.*, 2004). Além disso, vários investigadores têm trabalhado com a hipótese do vitiligo ser causado por um desequilíbrio no controle da morte de melanócitos por apoptose (Huang, Nordlund *et al.*, 2002; Lee, Youm *et al.*, 2004; Lee, Kim *et al.*, 2005). No entanto, análises funcionais futuras se fazem necessárias para identificar como o *NALP1* estaria efetivamente envolvido na patogênese do vitiligo.

6.2. *LTA* (Linfotoxina Alfa)

O interesse em estudar o gene *LTA* foi baseado na evidência de ligação genética detectada no *locus* 6p21-p22 em famílias de Chineses afetados com vitiligo (Liang, Yang *et al.*, 2007). Até o momento, nenhuma variante genética foi confirmada nesta região, com exceção dos alelos HLA. Por outro lado, variações no gene *LTA* foram implicadas em um número de outras doenças autoimunes (Lu, Cheng *et al.*, 2005; Boraska, Zeggini *et al.*, 2009), fazendo deste gene um possível *locus* de suscetibilidade a doenças autoimunes em geral.

Nosso resultado é possivelmente o primeiro a mostrar evidência de associação entre vitiligo *per se* e o polimorfismo na posição +252 do gene *LTA* em uma grande amostra de famílias sul-brasileiras, achado replicado, com significância marginal e na direção contrária, em uma população caso-controle independente. Pode-se especular que o motivo da inversão do sentido de associação, com o alelo “A” sendo de risco na população de famílias e de proteção na amostra caso-controle, seja devido à falta de poder estatístico da análise.

Um achado interessante foi à concentração do sinal de associação observado para a população total de famílias entre os casos de vitiligo de aparecimento precoce ($p = 0,04$), sugerindo um papel do gene *LTA* no controle desta forma da doença. Este achado é semelhante ao observado recentemente para hanseníase: um desenho de estudo baseado em família e caso-controle mostrou que associação entre hanseníase e variantes *LTA* é idade dependente, sendo mais evidente em

populações de início precoce (Alcais, Alter *et al.*, 2007). Vitiligo de início precoce 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. Ainda, vitiligo de início precoce está associado com aumento do risco relativo da doença (Alkhateeb, Fain *et al.*, 2003). No conjunto, estas observações sugerem que o vitiligo de início precoce tenha um componente genético de controle mais evidente que a doença de aparecimento tardio, hipótese reforçada por nosso achado. Interessantemente, observou-se diferença das médias de idade entre as populações de famílias e caso-controle. A população caso-controle tem uma média de idade de início do vitiligo mais velha, de aproximadamente 25 ± 15 anos, enquanto a população de famílias tem uma média de idade de início do vitiligo de 18 ± 11 anos. No contexto do discutido acima, esta diferença pode ser responsável pelo sinal de associação marginalmente significativo observado para a população caso-controle.

Ao estratificar a população por forma clínica e doença autoimune, verificamos que a associação se concentra no sub-grupo apresentando tipo clínico não-segmentar. Porém, é possível que a ausência de sinal de associação nas sub-populações de vitiligo segmentar e com aparecimento acima dos 25 anos seja devido ao baixo número de famílias informativas em ambos os grupos, hipótese que poderia ser testada com o aumento do tamanho amostral dos mesmos.

O significado da associação observada entre alelos do *locus LTA* com a suscetibilidade ao vitiligo é de difícil interpretação devido ao fato deste *locus* estar em LD com alelos do MHC. A investigação da possibilidade da associação observada para o *locus LTA* ser devido a LD com outro gene HLA classe II e III é extremamente complexa, devido à alta densidade de genes nesses *loci* e ao extenso padrão de LD entre eles. Assim, uma cuidadosa avaliação da variante +252 do gene *LTA* ajustada para LD com *loci* HLA é necessária para elucidar o papel deste gene na suscetibilidade ao vitiligo na população sul-brasileira.

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

Existem evidências que o $TNF\alpha$ apresenta um importante papel na suscetibilidade ao vitiligo. Por exemplo, o uso de terapias anti-fator de necrose tumoral causam repigmentação na pele possivelmente pela diminuição da expressão dessa citocina na área lesionada (Lv, Li *et al.*, 2009). Além disso, Birol e col. detectaram um significativo aumento da expressão de $TNF\alpha$ na pele de pacientes afetados por vitiligo quando comparados a controles saudáveis, sugerindo que a produção dessa citocina pudesse estar envolvida no vitiligo (Birol, Kisa *et al.*, 2006).

Nosso resultado mostrou que o polimorfismo de região promotora do gene *TNFA* (-308 G/A) não está associado com suscetibilidade ao vitiligo e suas manifestações clínicas nos pacientes sul-brasileiros. Estudos de associação genética entre *TNFA* e suscetibilidade ao vitiligo têm gerado resultados conflitantes. Um estudo de associação caso-controle realizado por Yazici e col., envolvendo 61 pacientes e 123 controles mostrou que o polimorfismo -308 G/A *TNFA* não está associado com suscetibilidade ao vitiligo e forma clínica em Turcos (Yazici, Erdal *et al.*, 2006). Em contrapartida, Namian e col. relataram que o polimorfismo *TNFA*-308 determina a suscetibilidade ao vitiligo em pacientes iranianas do sexo feminino ($p=0,0001$) (Namian, Shahbaz *et al.*, 2009). No entanto, os próprios autores admitem que a frequência genotípica nas pacientes do sexo feminino para o polimorfismo -308 do gene *TNFA* não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg; além disso, sabe-se que vitiligo não afeta diferencialmente homens e mulheres (Majumder, Das *et al.*, 1988; Nath, Majumder *et al.*, 1994).

Apesar do resultado negativo, a influência deste gene na suscetibilidade ao vitiligo não pode ser descartada visto que estudos adicionais se fazem necessário, devido à existência de outros polimorfismos comuns na região promotora do gene *TNFA* (-1031T/C, -863C/A e -857C/T) que estão associados a doenças imunológicas mediadas como, artrite reumatóide e doença de Crohn (Negoro, Kinouchi *et al.*, 1999; Waldron-Lynch, Adams *et al.*, 2001).

Devido à curta distância (1240 bp) entre os genes *TNFA* e *LTA*, foi construído o haplótipo envolvendo os alelos de riscos dos polimorfismos na posição +252 do gene *LTA* e -308 do gene *TNFA*, o qual apresentou uma frequência haplotípica muito baixa e sem famílias informativas, não permitindo análise. No entanto, análise

haplotípica entre o alelo “G” do gene *LTA*+252 e o alelo “G” do gene *TNFA*-308 mostrou um efeito de proteção nessa população. Diante disso, podemos especular que o polimorfismo -308 do gene *TNFA* individualmente não influencia a suscetibilidade ao vitiligo, porém o haplótipo formado com *LTA*+252 confere uma proteção contra o desenvolvimento da doença.

6.4. Considerações Finais

Apesar de o vitiligo ser a mais comum doença de pigmentação da pele, com impacto evidente sobre a qualidade de vida dos indivíduos afetados, sua fisiopatogênese ainda é desconhecida. Nosso estudo utilizou um desenho baseado em família para testar associação dos genes *NALP1*, *TNFA* e *LTA* com vitiligo *per se* e suas manifestações clínicas, uma técnica que evita achados espúrios de associação causados por estratificação críptica das populações em estudo.

Nossos achados sugerem que variações nos genes *LTA* e *NALP1* são fatores de risco para vitiligo. Sendo o gene *LTA* associado com início precoce do vitiligo, e o gene *NALP1* com ausência de doenças autoimune associada. Nenhuma evidência de associação foi encontrada entre variantes do gene *TNFA* e suscetibilidade a fenótipos do vitiligo. Análises funcionais futuras são necessárias para identificar a base biológica dos efeitos genéticos observados para os genes *NALP1* e *LTA*.

7. CONCLUSÕES

1. O alelo “A” do marcador rs6502867 do gene *NALP1* está associado a um aumento da suscetibilidade ao vitiligo *per se*, independente da ocorrência de co-morbidade autoimune;
2. O alelo “A” na posição +252 do gene *LTA* está associado a um aumento da suscetibilidade ao vitiligo *per se* na amostra populacional de famílias, e com proteção na amostra populacional caso-controle, esta última com significância marginal;
3. A associação do polimorfismo +252 do gene *LTA* é mais evidente em uma sub-população com idade de início precoce e apresentando vitiligo do tipo clínico não-segmentar;
4. O polimorfismo da região promotora do gene *TNFA* (-308 G/A) não está associado à suscetibilidade ao vitiligo e suas manifestações clínicas na amostra populacional estudada;
5. O haplótipo formado entre o alelo “G” do gene *LTA*+252 e o alelo “G” do gene *TNFA*-308 mostrou efeito de proteção para ocorrência de vitiligo *per se*.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS – PROGRESSÃO PARA DOUTORADO

8.1. Justificativa

O estudo inicial intitulado de “FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO – ANÁLISE DE GENES CANDIDATOS” teve como objetivo inicial estudar marcadores dos genes *NALP1*, *LTA* e *TNFA*. No entanto, durante o desenvolvimento do estudo percebemos que para se ter um melhor entendimento da participação das regiões cromossômicas, identificadas em estudos anteriores, na participação à suscetibilidade ao vitiligo, havia a necessidade de ampliar este estudo a fim de estudar novos genes candidatos. No 2º semestre de 2008 tivemos a oportunidade de ampliar este estudo genotipando 70 marcadores adicionais em uma plataforma de alto rendimento Sequenom® no laboratório da McGill University - *Génome Québec Innovation Centre*, Montreal - Canadá.

Tendo em vista a necessidade do segmento das análises desses marcadores já genotipados e replicação dos achados positivos em uma população independente caso-controle, já recrutada, propomos aqui a continuidade da pesquisa como um projeto de doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Neste contexto, metodologia adicional, resultados parciais e um novo cronograma são apresentados a seguir.

8.2. Metodologia

8.2.1. Seleção dos genes e marcadores candidatos

Foi realizado no ano de 2008 um mapeamento fino das principais regiões genômicas em ligação com o vitiligo que havia a necessidade da identificação de genes e variações genéticas responsáveis pelo sinal de ligação encontrado ou ainda das variantes genéticas relevantes que, no entanto, necessitavam de estudos adicionais. Esta etapa foi realizada usando a ferramenta Map Viewer.

Para o estudo genético, o principal foco de nossa investigação foi sobre regiões genômicas já descritas (Spritz, Gowan *et al.*, 2004; Chen, Huang *et al.*, 2005; Liang, Yang *et al.*, 2007) e genes candidatos que apresentavam envolvimento não-autoimune, tais como de resposta ao stresse oxidativo e adesão celular, bem como genes candidatos já descritos em associação com o vitiligo, mas que precisavam ser replicados em diferentes populações. A seleção dos marcadores do tipo Tag SNP para os genes selecionados foi realizada levando em consideração a estrutura de LD 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. O número total de marcadores foi definido pela extensão da região genômica sob investigação e cobertura total dos genes selecionados. Na tabela 11 estão descritas regiões genômicas, genes e números de marcadores selecionados para o estudo.

Tabela 11: Relação dos genes genotipados na plataforma Sequenom®.

REGIÃO CROMOSSOMICA	GENE	MARCADORES	OBSERVAÇÃO
3q26.1	<i>BCHE</i>	10	Hipótese nova
4q31.23	<i>EDNRA</i>	4	Hipótese nova
6q21.3	<i>DDR1</i>	3	Hipótese nova
6p24.1	<i>EDN1</i>	3	Replicação
7q11.23	<i>PTPN12</i>	5	Hipótese nova
8p21.1	<i>PTK2B</i>	14	Hipótese nova
8p11.23	<i>ADAM9</i>	12	Hipótese nova
8q24.1	<i>NOV</i>	2	Hipótese nova
10q24.1	<i>FAS</i>	5	Replicação
16q22.1	<i>CDH1</i>	10	Hipótese nova
22q11.21	<i>COMT</i>	2	Replicação

8.2.2. Genotipagem na plataforma de alto rendimento Sequenom®

A genotipagem dos marcadores foi realizada na plataforma de alto rendimento Sequenom® MassARRAY, que usa o ensaio denominado de iPLEX. O ensaio iPLEX é baseado em uma amplificação inicial dos fragmentos genômicos em um PCR multiplex. As reações foram realizadas em um 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 seqüência 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.

8.3. Resultados Parciais

Até o presente momento foram genotipados 70 marcadores para os 11 genes candidatos selecionados na plataforma de alto rendimento Sequenom®. Nesta etapa foram gerados aproximadamente 39.000 genótipos, os quais apresentaram uma taxa de erro mendeliano de 3%. O experimento teve uma boa performance com 98% de sucesso na geração de genótipos para todas as amostras testadas. Dos marcadores testados, quatro SNPs falharam por serem pouco polimórficos, e 91% deles apresentaram FAM superior a 0,05. Todos os dados gerados na genotipagem

já foram tabulados em formato *linkage*, necessário para serem lidos pelos softwares de análises. Famílias que apresentaram inconsistências mendelianas foram excluídas da análise. A estratégia de análise de associação baseada em famílias do estudo inicial será aplicada para os 66 marcadores dos genes selecionados.

8.4. Cronograma

A extensão do estudo inicial intitulado “FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO – ANÁLISE DE GENES CANDIDATOS” será desenvolvida durante o 2º semestre de 2009 e 1º semestre de 2010. No cronograma abaixo estão descritas as etapas restantes para a finalização do estudo, bem como o tempo necessário para execução de cada uma (quadro 5).

CRONOGRAMA EXECUÇÃO DOUTORADO						
ANO 2009	jul/09	ago/09	set/09	out/09	nov/09	dez/09
Análise estatística	X	X				
Genotipagem dos marcadores associados - Replicação			X	X	X	X
Análise estatística - Replicação						
Escrever/Submeter Artigo						
Defesa Doutorado						
ANO 2010	jan/10	fev/10	mar/10	abr/10	mai/10	jun/10
Análise estatística						
Genotipagem dos marcadores associados - Replicação						
Análise estatística - Replicação	X	X				
Escrever/Submeter Artigo			X	X	X	
Defesa Doutorado						X

Quadro 5: Cronograma de execução das atividades do doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Al-Fouzan, A., M. Al-Arbash, *et al.* Study of HLA class I/II and T lymphocyte subsets in Kuwaiti vitiligo patients. Eur J Immunogenet, v.22, n.2, Apr, p.209-13. 1995.

Alcais, A., A. Alter, *et al.* Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. Nat Genet, v.39, n.4, Apr, p.517-22. 2007.

Alkhateeb, A., P. R. Fain, *et al.* Candidate functional promoter variant in the FOXD3 melanoblast developmental regulator gene in autosomal dominant vitiligo. J Invest Dermatol, v.125, n.2, Aug, p.388-91. 2005.

_____. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. Pigment Cell Res, v.16, n.3, Jun, p.208-14. 2003.

Alkhateeb, A., G. L. Stetler, *et al.* Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-p32.2. Hum Mol Genet, v.11, n.6, Mar 15, p.661-7. 2002.

Arcos-Burgos, M., E. Parodi, *et al.* Vitiligo: complex segregation and linkage disequilibrium analyses with respect to microsatellite loci spanning the HLA. Hum Genet, v.110, n.4, Apr, p.334-42. 2002.

Biol, A., U. Kisa, *et al.* Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1 alpha (IL1-alpha) levels in the lesional skin of patients with nonsegmental vitiligo. Int J Dermatol, v.45, n.8, Aug, p.992-3. 2006.

Blanco, P., A. K. Palucka, *et al.* Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. Cytokine Growth Factor Rev, v.19, n.1, Feb, p.41-52. 2008.

Blomhoff, A., E. H. Kemp, *et al.* CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases. Pigment Cell Res, v.18, n.1, Feb, p.55-8. 2005.

Boone, B., K. Ongenae, *et al.* Topical pimecrolimus in the treatment of vitiligo. Eur J Dermatol, v.17, n.1, Jan-Feb, p.55-61. 2007.

Boraska, V., E. Zeggini, *et al.* Family-based analysis of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha tag polymorphisms with type 1 diabetes in the population of South Croatia. Hum Immunol, v.70, n.3, Mar, p.195-9. 2009.

Buc, M., H. Fazekasova, *et al.* Occurrence rates of HLA-DRB1, HLA-DQB1, and HLA-DPB1 alleles in patients suffering from vitiligo. Eur J Dermatol, v.8, n.1, Jan-Feb, p.13-5. 1998.

Cabrera, M., M. A. Shaw, *et al.* Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. J Exp Med, v.182, n.5, Nov 1, p.1259-64. 1995.

Canton, I., S. Akhtar, *et al.* A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. Genes Immun, v.6, n.7, Oct, p.584-7. 2005.

Casp, C. B., J. X. She, *et al.* Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. Pigment Cell Res, v.15, n.1, Feb, p.62-6. 2002.

_____. Genes of the LMP/TAP cluster are associated with the human autoimmune disease vitiligo. Genes Immun, v.4, n.7, Oct, p.492-9. 2003.

Castanet, J. e J. P. Ortonne. Pathophysiology of vitiligo. Clin Dermatol, v.15, n.6, Nov-Dec, p.845-51. 1997.

Chen, J. J., W. Huang, *et al.* A novel linkage to generalized vitiligo on 4q13-q21 identified in a genomewide linkage analysis of Chinese families. Am J Hum Genet, v.76, n.6, Jun, p.1057-65. 2005.

Cho, S., H. C. Kang, *et al.* Characteristics of vitiligo in Korean children. Pediatr Dermatol, v.17, n.3, May-Jun, p.189-93. 2000.

Chu, Z. L., F. Pio, *et al.* A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. J Biol Chem, v.276, n.12, Mar 23, p.9239-45. 2001.

Dunston, G. M. e R. M. Halder. Vitiligo is associated with HLA-DR4 in black patients. A preliminary report. Arch Dermatol, v.126, n.1, Jan, p.56-60. 1990.

Economou, J. S., K. Rhoades, *et al.* Genetic analysis of the human tumor necrosis factor alpha/cachectin promoter region in a macrophage cell line. J Exp Med, v.170, n.1, Jul 1, p.321-6. 1989.

El-Mofty, A. M. e M. El-Mofty. Vitiligo. A symptom complex. Int J Dermatol, v.19, n.5, Jun, p.237-44. 1980.

Fain, P. R., S. R. Babu, *et al.* HLA class II haplotype DRB1*04-DQB1*0301 contributes to risk of familial generalized vitiligo and early disease onset. Pigment Cell Res, v.19, n.1, Feb, p.51-7. 2006.

Fain, P. R., K. Gowan, *et al.* A genomewide screen for generalized vitiligo: confirmation of AIS1 on chromosome 1p31 and evidence for additional susceptibility loci. Am J Hum Genet, v.72, n.6, Jun, p.1560-4. 2003.

Finco, O., M. Cuccia, *et al.* Age of onset in vitiligo: relationship with HLA supratypes. Clin Genet, v.39, n.1, Jan, p.48-54. 1991.

Fitzpatrick, T. B. e I. M. Freedberg. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division. 2003. 2 v. (xxxiii, 2594, 138 p.) p.

Foley, L. M., N. J. Lowe, *et al.* Association of HLA-DR4 with vitiligo. J Am Acad Dermatol, v.8, n.1, Jan, p.39-40. 1983.

Freilich, A. R. Tzaraat--"biblical leprosy". J Am Acad Dermatol, v.6, n.1, Jan, p.131-4. 1982.

Gauthier, Y., M. Cario Andre, *et al.* A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? Pigment Cell Res, v.16, n.4, Aug, p.322-32. 2003.

Goldman, L., R. S. Moraites, *et al.* White spots in biblical times. A background for the dermatologist for participation in discussions of current revisions of the bible. Arch Dermatol, v.93, n.6, Jun, p.744-53. 1966.

Grimes, P. E., R. Morris, *et al.* Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. J Am Acad Dermatol, v.51, n.1, Jul, p.52-61. 2004.

Gupta, S. e S. Gollapudi. Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in naive and memory T cell subsets. Autoimmun Rev, v.5, n.4, Apr, p.264-8. 2006.

Hann, S.-K., and Nordlund, J. Vitiligo: Blackwell. 2000

Hann, S. K. e H. J. Lee. Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. J Am Acad Dermatol, v.35, n.5 Pt 1, Nov, p.671-4. 1996.

Horvath, S., X. Xu, *et al.* The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. Eur J Hum Genet, v.9, n.4, Apr, p.301-6. 2001.

Howitz, J., H. Brodthagen, *et al.* Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. Arch Dermatol, v.113, n.1, Jan, p.47-52. 1977.

Huang, C. L., J. J. Nordlund, *et al.* Vitiligo: a manifestation of apoptosis? Am J Clin Dermatol, v.3, n.5, p.301-8. 2002.

Jin, S. Y., H. H. Park, *et al.* Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism of vitiligo in Korean population. Pigment Cell Res, v.17, n.1, Feb, p.84-6. 2004.

_____. Association of estrogen receptor 1 intron 1 C/T polymorphism in Korean vitiligo patients. J Dermatol Sci, v.35, n.3, Sep, p.181-6. 2004.

- Jin, Y., S. A. Birlea, *et al.* Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. J Invest Dermatol, v.127, n.11, Nov, p.2558-62. 2007.
- Jin, Y., C. M. Mailloux, *et al.* NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. N Engl J Med, v.356, n.12, Mar 22, p.1216-25. 2007.
- John, S. W., G. Weitzner, *et al.* A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. Nucleic Acids Res, v.19, n.2, Jan 25, p.408. 1991.
- Kemp, E. H., R. A. Ajjan, *et al.* Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. Br J Dermatol, v.140, n.1, Jan, p.73-8. 1999.
- Kim, H. J., C. P. Choi, *et al.* The association between endothelin-1 gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo in a Korean population. Exp Dermatol, v.16, n.7, Jul, p.561-6. 2007.
- Koga, M. e T. Tango. Clinical features and course of type A and type B vitiligo. Br J Dermatol, v.118, n.2, Feb, p.223-8. 1988.
- Kopera, D. History and Cultural aspects of Vitiligo. In: Vitiligo (eds. Hann, SK.; Nordlund, J.J.): Blackwell-Science. Oxford. 2000. p.13-417 p.
- Laberge, G., C. M. Mailloux, *et al.* Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. Pigment Cell Res, v.18, n.4, Aug, p.300-5. 2005.
- Laberge, G. S., D. C. Bennett, *et al.* PTPN22 is genetically associated with risk of generalized vitiligo, but CTLA4 is not. J Invest Dermatol, v.128, n.7, Jul, p.1757-62. 2008.
- Lander, E. S. e N. J. Schork. Genetic dissection of complex traits. Science, v.265, n.5181, Sep 30, p.2037-48. 1994.
- Le Poole, I. C., R. M. Van Den Wijngaard, *et al.* Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. J Invest Dermatol, v.100, n.6, Jun, p.816-22. 1993.
- Lee, A. Y., N. H. Kim, *et al.* 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, v.124, n.5, May, p.976-83. 2005.
- Lee, A. Y., Y. H. Youm, *et al.* 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, v.151, n.5, Nov, p.995-1003. 2004.

- Lee, Y. H., J. B. Harley, *et al.* Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. Eur J Hum Genet, v.14, n.3, Mar, p.364-71. 2006.
- Lerner, A. B. Vitiligo. J Invest Dermatol, v.32, n.2, Part 2, Feb, p.285-310. 1959.
- Li, M., D. Sun, *et al.* Functional polymorphisms of the FAS gene associated with risk of vitiligo in Chinese populations: a case-control analysis. J Invest Dermatol, v.128, n.12, Dec, p.2820-4. 2008.
- Liang, Y., S. Yang, *et al.* Evidence for Two Susceptibility Loci on Chromosomes 22q12 and 6p21-p22 in Chinese Generalized Vitiligo Families. J Invest Dermatol, Jun 14. 2007.
- Lin, J. Y. e D. E. Fisher. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature, v.445, n.7130, Feb 22, p.843-50. 2007.
- Lin, S. L., J. D. Miller, *et al.* Intronic MicroRNA (miRNA). J Biomed Biotechnol, v.2006, n.4, p.26818. 2006.
- Lin, S. L. e S. Y. Ying. Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. Methods Mol Biol, v.342, p.295-312. 2006.
- Liu, J. B., M. Li, *et al.* Association of vitiligo with HLA-A2: a meta-analysis. J Eur Acad Dermatol Venereol, v.21, n.2, Feb, p.205-13. 2007.
- Lorini, R., G. Orecchia, *et al.* Autoimmunity in vitiligo: relationship with HLA, Gm and Km polymorphisms. Autoimmunity, v.11, n.4, p.255-60. 1992.
- Lu, L. Y., H. H. Cheng, *et al.* Tumor necrosis factor-beta +252A polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus in Taiwan. J Formos Med Assoc, v.104, n.8, Aug, p.563-70. 2005.
- Lu, T., S. Yu, *et al.* Collection and comparative analysis of 1888 full-length cDNAs from wild rice *Oryza rufipogon* Griff. W1943. DNA Res, v.15, n.5, Oct, p.285-95. 2008.
- Lv, Y., Q. Li, *et al.* Use of anti-tumor necrosis factor agents: A possible therapy for vitiligo. Med Hypotheses, v.72, n.5, May, p.546-7. 2009.
- Magitta, N. F., A. S. Boe Wolff, *et al.* A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. Genes Immun, v.10, n.2, Mar, p.120-4. 2009.
- Majumder, P. P., S. K. Das, *et al.* A genetical model for vitiligo. Am J Hum Genet, v.43, n.2, Aug, p.119-25. 1988.
- Majumder, P. P., J. J. Nordlund, *et al.* Pattern of familial aggregation of vitiligo. Arch Dermatol, v.129, n.8, Aug, p.994-8. 1993.

- Martinez-Esparza, M., C. Jimenez-Cervantes, *et al.* Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem, v.255, n.1, Jul 1, p.139-46. 1998.
- Martinon, F., K. Burns, *et al.* The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell, v.10, n.2, Aug, p.417-26. 2002.
- Mehta, N. R., K. C. Shah, *et al.* Epidemiological study of vitiligo in Surat area, South Gujarat. Indian J Med Res, v.61, n.1, Jan, p.145-54. 1973.
- Metzker, A., R. Zamir, *et al.* Vitiligo and the HLA system. Dermatologica, v.160, n.2, p.100-5. 1980.
- Miceli-Richard, C., S. Lesage, *et al.* CARD15 mutations in Blau syndrome. Nat Genet, v.29, n.1, Sep, p.19-20. 2001.
- Mills Md, A. D. H., Sk; Nordlund, J.J. . Ocular and otic findings in Vitiligo. In: Vitiligo.: Blackwell-Science 2000
- Mira, J. P., A. Cariou, *et al.* Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. Jama, v.282, n.6, Aug 11, p.561-8. 1999.
- Moretti, S., A. Spallanzani, *et al.* New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. Pigment Cell Res, v.15, n.2, Apr, p.87-92. 2002.
- Namian, A. M., S. Shahbaz, *et al.* Association of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha polymorphisms with susceptibility to vitiligo in Iranian patients. Arch Dermatol Res, v.301, n.1, Jan, p.21-5. 2009.
- Nath, S. K., J. A. Kelly, *et al.* Evidence for a susceptibility gene, SLEV1, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. Am J Hum Genet, v.69, n.6, Dec, p.1401-6. 2001.
- Nath, S. K., P. P. Majumder, *et al.* Genetic epidemiology of vitiligo: multilocus recessivity cross-validated. Am J Hum Genet, v.55, n.5, Nov, p.981-90. 1994.
- Nedwin, G. E., S. L. Naylor, *et al.* Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. Nucleic Acids Res, v.13, n.17, Sep 11, p.6361-73. 1985.
- Negoro, K., Y. Kinouchi, *et al.* Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. Gastroenterology, v.117, n.5, Nov, p.1062-8. 1999.

Nicklas, J. A., M. T. Falta, *et al.* Molecular analysis of in vivo hprt mutations in human T lymphocytes. V. Effects of total body irradiation secondary to radioimmunoglobulin therapy (RIT). Mutagenesis, v.5, n.5, Sep, p.461-8. 1990.

Nordlund, J. J., Ortonne, Jean-Paul, Le Poole, I. Caroline. The pigmentary system : physiology and pathophysiology. Malden, Mass.: Blackwell Pub. 2006

Ogura, Y., D. K. Bonen, *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature, v.411, n.6837, May 31, p.603-6. 2001.

Onay, H., M. Pehlivan, *et al.* Might there be a link between mannose binding lectin and vitiligo? Eur J Dermatol, v.17, n.2, Mar-Apr, p.146-8. 2007.

Orecchia, G., L. Perfetti, *et al.* Vitiligo is associated with a significant increase in HLA-A30, Cw6 and DQw3 and a decrease in C4AQ0 in northern Italian patients. Dermatology, v.185, n.2, p.123-7. 1992.

Ortonne, B. P. F. T. B. J. P. Vitiligo. In: Dermatology in General Medicine New York: McGraw-Hill. 2005

Ozaki, K., Y. Ohnishi, *et al.* Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. Nat Genet, v.32, n.4, Dec, p.650-4. 2002.

Park, H. H., E. Ha, *et al.* Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. Exp Dermatol, v.15, n.5, May, p.377-80. 2006.

Pennica, D., G. E. Nedwin, *et al.* Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature, v.312, n.5996, Dec 20-1985 Jan 2, p.724-9. 1984.

Picardo, M., S. Passi, *et al.* Antioxidant status in the blood of patients with active vitiligo. Pigment Cell Res, v.7, n.2, Apr, p.110-5. 1994.

Porter, J. H., Sk; Nordlund, J.J. The psychological effects of vitiligo: response to impaired appearance: Blackwell-Science. 2000. p 35-48 p.

Rink, L. e H. Kirchner. Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. Int Arch Allergy Immunol, v.111, n.3, Nov, p.199-209. 1996.

Schallreuter, K. U., R. Lemke, *et al.* Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. Dermatology, v.188, n.4, p.269-75. 1994.

Schallreuter, K. U., J. M. Wood, *et al.* Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo. Arch Dermatol Res, v.288, n.1, p.14-8. 1996.

- Shin, H. D., S. W. Yang, *et al.* Independent association of tumor necrosis factor polymorphism with type 1 diabetes susceptibility. Ann N Y Acad Sci, v.1150, Dec, p.76-85. 2008.
- Spritz, R. A., K. Gowan, *et al.* 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, v.74, n.1, Jan, p.188-91. 2004.
- Tabor, H. K., N. J. Risch, *et al.* Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. Nat Rev Genet, v.3, n.5, May, p.391-7. 2002.
- Taieb, A. NALP1 and the inflammasomes: challenging our perception of vitiligo and vitiligo-related autoimmune disorders. Pigment Cell Res, v.20, n.4, Aug, p.260-2. 2007.
- Tastan, H. B., A. Akar, *et al.* Association of HLA class I antigens and HLA class II alleles with vitiligo in a Turkish population. Pigment Cell Res, v.17, n.2, Apr, p.181-4. 2004.
- Tazi-Ahnini, R., A. J. Mcdonagh, *et al.* The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. Br J Dermatol, v.159, n.3, Sep, p.591-6. 2008.
- Thomson, G. e M. S. Esposito. The genetics of complex diseases. Trends Cell Biol, v.9, n.12, Dec, p.M17-20. 1999.
- Trombone, A. P., C. R. Cardoso, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor-alpha in diseased periodontal tissues. J Periodontal Res, Dec 11. 2008.
- Tschopp, J., F. Martinon, *et al.* NALPs: a novel protein family involved in inflammation. Nat Rev Mol Cell Biol, v.4, n.2, Feb, p.95-104. 2003.
- Tu, C. X., J. S. Gu, *et al.* Increased interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor levels in the sera of patients with non-segmental vitiligo. J Dermatol Sci, v.31, n.1, Feb, p.73-8. 2003.
- Tursen, U., T. I. Kaya, *et al.* Association between catechol-O-methyltransferase polymorphism and vitiligo. Arch Dermatol Res, v.294, n.3, May, p.143-6. 2002.
- Van Den Wijngaard, R., A. Wankowicz-Kalinska, *et al.* 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, v.80, n.8, Aug, p.1299-309. 2000.
- Venkataram, M. N., A. G. White, *et al.* HLA antigens in Omani patients with vitiligo. Clin Exp Dermatol, v.20, n.1, Jan, p.35-7. 1995.

Venneker, G. T., W. Westerhof, *et al.* Molecular heterogeneity of the fourth component of complement (C4) and its genes in vitiligo. J Invest Dermatol, v.99, n.6, Dec, p.853-8. 1992.

Vogel, M., J. Nattermann, *et al.* Pegylated interferon-alpha for the treatment of sexually transmitted acute hepatitis C in HIV-infected individuals. Antivir Ther, v.11, n.8, p.1097-101. 2006.

Waldron-Lynch, F., C. Adams, *et al.* Tumour necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families. Genes Immun, v.2, n.2, Apr, p.82-7. 2001.

Wilson, A. G., N. De Vries, *et al.* An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. J Exp Med, v.177, n.2, Feb 1, p.557-60. 1993.

Wilson, A. G., F. S. Di Giovine, *et al.* Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. Hum Mol Genet, v.1, n.5, Aug, p.353. 1992.

Xia, Q., W. M. Zhou, *et al.* MHC haplotypic association in Chinese Han patients with vitiligo. J Eur Acad Dermatol Venereol, v.20, n.8, Sep, p.941-6. 2006.

Yazici, A. C., M. E. Erdal, *et al.* Lack of association with TNF-alpha-308 promoter polymorphism in patients with vitiligo. Arch Dermatol Res, v.298, n.1, Jun, p.46-9. 2006.

Zamani, M., M. Spaepen, *et al.* Linkage and association of HLA class II genes with vitiligo in a Dutch population. Br J Dermatol, v.145, n.1, Jul, p.90-4. 2001.

Zhang, X. J., J. B. Liu, *et al.* Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. J Am Acad Dermatol, v.51, n.3, Sep, p.383-90. 2004.

Zhang, Z., S. X. Xu, *et al.* The analysis of genetics and associated autoimmune diseases in Chinese vitiligo patients. Arch Dermatol Res, v.301, n.2, Feb, p.167-73. 2009.

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Susceptibilidade ao vitiligo

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

1) Métodos

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

2) Local do estudo

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

3) Permissão para estocagem

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

uso da sua amostra estocada terá como condição uma nova avaliação e aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética pertinente.

4) Riscos Físicos para Saúde/Desconfortos

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

5) Tratamento e Compensação por Danos

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

6) Alternativas

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

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

7) Custos para os participantes

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

8) Benefícios

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

9) Reembolso

Você não será reembolsado por participar deste estudo.

10) Exclusividade do uso do material genético

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

11) Confidenciabilidade dos dados

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

CONSENTIMENTO

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Susceptibilidade ao vitiligo

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

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

A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTARIA

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

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

Assinatura ou impressão digital do voluntário

Nome completo e nº do prontuário

Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

Assinatura testemunha 1

Assinatura testemunha 2

____/____/____
Data

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF PARANÁ

RESEARCH ETHICS COMMITTEE

Curitiba (Brazil), 2008-02-12

To whom it may concerns

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

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. Surugi de 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

