

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

SISBI/UFU



1000215594

N.º 00  
616.514  
F3630  
TES/MEU

INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DA  
VITAMINA D EM PACIENTES COM PSORÍASE

Aluno: Cristiano de Abreu Amorim Fernandes

Orientador: P<sup>rofa</sup>. D<sup>ra</sup>. Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: P<sup>rofa</sup>. D<sup>ra</sup>. Isabela Maria Bernardes Goulart

UBERLÂNDIA - MG  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DA  
VITAMINA D EM PACIENTES COM PSORÍASE**

Aluno: Cristiano de Abreu Amorim Fernandes

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA-MG  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DA  
VITAMINA D EM PACIENTES COM PSORÍASE**

ALUNO Cristiano de Abreu Amorim Fernandes

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: **Prof<sup>a</sup> Dra Ana Maria Bonetti (Orientador) – INGEB / UFU**

Examinadores:

**Prof Dr Carlos R. Ceron – UNESP – São José do Rio Preto / SP**

**Prof Dr Warwick Estevam Kerr – INGEB / UFU**

Data da Defesa: 05 / 09 / 2003

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da  
Dissertação / Tese foram contempladas



(Orientador)

Uberlândia, 06 / 10 / 2003

“A minha filha, **Lais Silvestre Fernandes**, que a ciência seja para ela, assim como para mim, o farol que mostra o caminho para um mundo melhor em meio a escuridão da ignorância humana...”

## Agradecimentos

Agradeço a **Profa Dra Ana Maria Bonetti**, Orientadora e Amiga; como poucas, uma pessoa capaz de entender o que significa a variabilidade genética, e como respeitar as diferenças criadas por ela. Agradeço pela orientação, não só científica mas também pessoal que fez de mim melhor, homem, pai, e cientista...

A **Dra Lillian Emiko Kato**, pelos ensinamentos, pelos momentos de apoio, colaboração e amizade, por me ensinar a arte médica e como exercê-la, por ter me ensinado valores maiores que a cultura pode transmitir. Por ter sido pedra fundamental nesta edificação.

Ao **Prof Dr Warwick Estevam Kerr**, pelo apoio, amizade, ensinamentos e pelo exemplo de comportamento ético e científico.

Ao **Prof Dr Carlos Roberto Ceron**, por participar desta Comissão Examinadora.

Ao **Prof Dr Heyder Diniz** pelas explicações, pela paciência com minha ignorância matemática e pela valiosa ajuda com a análise estatística da tese.

Aos **Pacientes**, pela mais importante colaboração, aquela realizada com humildade e solidariedade. Que a ajuda por eles prestada não seja em vão, e que a maior beneficiada por ela seja a Humanidade.

A **Dra Isabela Maria Bernardes Goulart** por ter co-orientado esse trabalho, permitindo que conduzíssemos essa investigação com rigor científico.

Ao **Prof Dr Luiz Ricardo Goulart Filho** por ter permitido utilizar seu Laboratório, bem como técnicas otimizadas por seus alunos.

A **Juliana Almeida Côbo** colega de laboratório, pela ajuda no processamento das amostras e por ter cedido as amostras que fizeram parte do controle deste trabalho.

Aos **Amigos do Laboratório de Genética e Genética Molecular – UFU**, pelo; apoio, força, estímulo e pela solidariedade.

Ao **Prof Dr Waldesse Piragé** pela disponibilidade, pelas sugestões, pelos ensinamentos com as técnicas otimizadas por ele, e ensinamentos de genética que foram de grande valia.

Ao amigo, **Gerson Mamed Fraissat** pela ajuda, apoio e colaboração nesta dissertação.

Aos **Amigos e Preceptores da Residência Médica do Hospital Ipiranga**, em especial, **Dr. Livânio Ferreira Rocha e Dra. Roberta Pillar**, pela amizade, companheirismo, coleguismo, e respeito.

Aos amigos, **Prof. Dr. João Batista Michelotto, Luciano Andrade Lopes, Adriana Suenaga, Wael e Hanna** pela amizade, e a presença constante.

Aos **Meus pais, Evandro, Marília, irmãos Sertório e Junior e suas esposas, Minha filha Lais e a Raquel Calvo Gonçalves**, pela paciência, amizade, respeito e carinho e por fazerem parte de minha pesquisa pessoal de vida, meu caminho e minha Luz.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| Agradecimentos .....  | v  |
| Abstract .....  | ix |
| Resumo Geral .....  | x  |
| Introdução Geral.....   | 1  |
| Psoríase .....  | 1  |
| Fisiopatogenia .....  | 3  |
| O Receptor de Vitamina D.....   | 6  |
| Polimorfismo do gene vdr .....  | 9  |
| Objetivos .....   | 11 |
| Justificativa.....  | 12 |
| Capítulo I – Análise do polimorfismo do gene vdr e Psoríase.....  | 13 |
| Resumo .....  | 13 |
| Abstract .....  | 14 |
| Material e Métodos .....  | 15 |
| Pacientes e obtenção de amostras.....   | 15 |
| Extração de DNA .....   | 16 |
| Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....   | 16 |
| Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....  | 17 |
| Análise Estatística.....  | 17 |
| Resultados.....   | 18 |
| Discussão .....   | 24 |
| Referências Bibliográficas.....   | 27 |
| Conclusões Gerais .....   | 32 |
| ANEXO I – Consentimento Informado.....  | 33 |
| ANEXO II – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) – Universidade<br>Federal de Uberlândia – MG..... | 34 |
| ANEXO III – PASI.....   | 35 |
| ANEXO IV – Restrições Enzimáticas .....   | 36 |
| ANEXO V – Protocolo de Extração de DNA de Tecidos .....   | 37 |
| ANEXO VI – Protocolo de Extração de DNA de Sangue.....  | 38 |
| ANEXO VII – Caracterização polimórfica dos pacientes.....   | 39 |

## Lista de Abreviaturas

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>APC</b>                     | Antigen Presenting Cell – Célula Apresentadora de Antígeno                              |
| <b>CEP</b>                     | Comissão de Ética em Pesquisa   |
| <b>HLA</b>                     | Human Leucocyte Antigen (Antígeno Leucocitário humano)                                  |
| <b>INF-<math>\gamma</math></b> | Interferon Gama   |
| <b>PASI</b>                    | Psoriasis Área and Severity Index (Índice de Severidade relacionado à área em Psoríase) |
| <b>PCR</b>                     | Polimerase Chain Reaction   |
| <b>Th1</b>                     | Linfócitos T Helper tipo 1  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tumor Necrosis Factor Alfa – Fator de Necrose Tumoral Alfa                              |
| <b>UFU</b>                     | Universidade Federal de Uberlândia  |
| <b>VDR</b>                     | Vitamin D Receptor (Receptor de vitamina D) em maiúsculas                               |
| <b>vdr</b>                     | Vitamin D Receptor gene (gene do receptor de vitamina D) em minúsculas                  |
| <b>TGase I</b>                 | Transglutaminase I.   |

## Abstract

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease characterized by appearance of erythematous, pruriginous scaling plaques strongly demarcated specially in knees, elbows, scalp and intergluteus groove, light spear body regions. The name comes from "Psora" a Greek word that means to itch. It's presente in 2% of population and hasn't a correlation with higher mortality or morbidity.

In it's pathogenesis immunological, genetics and cell-to-cell interactions play some role. It seams to have a disfunction in T CD4 cells, that after contact with antigen presenting cell from epidermis, became activated and become to present surface receptors and to accumulate in epidermis.

Since the first studies, genetic behavior became clear. Nevertheless a specifc gene wasn't blamed yet. Many genes related to higher risk of present psoriasis has been reported, among them we drive attention to the ones called PSOR 1 to PSOR7 in which some genetic loci as HLA-Cw06 and DR7 had been blamed.

Vitamin D has it's own role in some metabolic ways, acting either by non-nuclear ways generating second messengers or nuclear ways, by heterodimerization with Vitamin D receptor (VDR) in the gene expression, activating or deactivating responsible regions of genes (VDRE).

Vitamin D receptor gene polymorphism had been studied in some populations with conflicting results. We investigated the Taq I, Fok I and Bsm I polymorphism using RFLP assays with restriction enzymes. Skin biopsies from psoriasis patients were compared with blood samples from non-psoriasis persons using an index of severity. Logistic regression did not reveal significant differences between group genotypes. Nor did Fisher's test disclose significant association between genotypes and the severity index. These findings were in agreement with the international literature. Our conclusion was that vdr polymorphism is not associated with the genesis of psoriasis and differences between some population groups may be due to the "founding effect".

## Resumo Geral

A psoríase é uma doença crônica inflamatória da pele, caracterizada pelo surgimento de placas eritematosas, pruriginosas, descamativas e fortemente demarcadas, principalmente, em joelhos, cotovelos, couro cabeludo e sulco interglúteo, regiões protegidas da luz solar. Seu nome deriva-se da palavra grega “*Psora*” que significa coçar, em virtude da principal característica da doença, o prurido. Acomete, mundialmente, cerca de 2% da população. Sua presença não se correlaciona com maior morbidade ou mortalidade, mas por suas manifestações, é estigmatizante.

Em sua patogênese concorrem fatores imunológicos, genéticos e de comunicação intercelular. Parece haver um distúrbio da função das células T CD4 que, após contato com as células apresentadoras de antígeno da epiderme, se ativam (T CD4<sup>+</sup>) e passam a expressar receptores em sua superfície e se acumular na epiderme.

Desde os primeiros estudos, o comportamento hereditário expôs o caráter genético da doença, porém, a implicação de um gene específico à patologia, não foi ainda estabelecida. Ao contrário, vários genes relacionados a maior risco de doença, tem sido relatados, dentre eles, genes chamados de PSOR1 a PSOR7, nos quais *loci* gênicos como os do HLA-Cw06 e DR7 foram implicados.

A Vitamina D tem participação no controle de algumas vias metabólicas da célula, atuando por meio de mecanismos não nucleares, pela formação de segundos mensageiros e mecanismos nucleares, com a heterodimerização com o Receptor da Vitamina D (VDR) atuando, diretamente, na expressão gênica a partir de ativação ou desativação de regiões responsáveis ao VDR (VDRE).

Polimorfismos no gene do receptor da vitamina D (*vdr*) foram estudados em várias populações com resultados às vezes conflitantes. Nesse trabalho, investigamos os polimorfismos Taq I, Fok I e Bsm I, por meio da técnica de RFLP, em biópsia de pele de pacientes portadores de psoríase, comparando com sangue periférico de controles não acometidos, com resultados concordantes aos da literatura mundial, qual seja, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e com psoríase, nas amostras em questão.

## Introdução Geral

### ***Psoríase***

A psoríase é uma doença crônica inflamatória da pele, caracterizada pelo surgimento de placas eritematosas, pruriginosas, descamativas e fortemente demarcadas, principalmente, em joelhos, cotovelos, couro cabeludo e sulco interglúteo (LEBWHOL, 2003) (Figura 1). O nome deriva-se do vocábulo grego “*Psora*” que significa coçar, em virtude da principal característica da doença, o prurido.



**Figura 1 - Placa psoriática em face ventral de membro inferior (Foto elaborada por FERNANDES, C.A.A. 2000)**

A psoríase pode ser classificada: 1) quanto à forma de apresentação em: Gutata, em Placa, Eritrodérmica, Pustulosa; 2) quanto ao início de aparecimento dos sintomas em: início precoce (tipo I) ou início tardio (tipo II); 3) quanto a resposta ou não a drogas e 4) quanto à severidade. Na maioria dos casos, porém, a classificação é meramente didática. Psoríase em Placas (ou Psoríase Vulgar) é a apresentação mais comum, ocorrendo em mais de 80% dos casos, seguida da forma Gutata, cerca de 10% e formas Eritrodérmica e Pustular, que ocorrem em menos de 3% cada (LEBWHOL, 2003).

A classificação quanto ao início dos sintomas parece ser a que guarda melhor relação com prognóstico e etiologia. Pacientes com psoríase tipo I apresentam maior probabilidade de terem parentes de primeiro grau afetados, maior correlação com Antígenos de Histocompatibilidade Linfocitário (HLA), idade de início antes dos 40 anos e um curso mais grave e com mais recorrências, quando comparados com os do tipo II, cuja idade de início de apresentação dos sintomas é acima de 40 anos (ELDER *et al.*, 1994 e ELDER *et al.*, 2001). Cerca de 4 a 5% dos pacientes podem apresentar acometimento articular em forma denominada de Artrite Psoriática, que pode ter uma apresentação destrutiva da articulação com perda irreparável do movimento.

O aparecimento das lesões pode guardar relação com infecções como na Psoríase Gutata e Streptococcia ou com trauma e fenômeno de Köebner (Figura 2), porém, na maioria das vezes não há relação comprovada com nenhum agente específico.



**Figura 2 - Fenômeno de Köebner (Foto elaborada por FERNANDES, C.A.A. 2000)**

A exposição solar parece ser um fator de melhora. Piora das lesões pode ocorrer relacionada à imunossupressão ou alterações do humor, além de infecções secundárias e uso de algumas medicações, entre elas os antiinflamatórios não hormonais e beta bloqueadores.

Estimativas da prevalência da doença variam entre 0,5% e 6%, com taxas variando nos países e grupos populacionais, com tendência a ser mais freqüente em altas latitudes (exposição solar) e em caucasianos do que em outros grupos (LEBWOHL 2003). No Japão, KAWADA *et al.* (2003) relataram incidência menor do que 2%.

Embora a psoríase possa trazer um grande efeito negativo na qualidade de vida dos pacientes afetados, o tempo médio de vida não parece estar reduzido, tão pouco maior incidência de co-morbidades foi comprovada. O diagnóstico da doença é feito em bases clínicas sendo raramente necessário a confirmação histopatológica (LEBWHOL 2003).

Os tratamentos para a psoríase são sintomáticos, nenhum leva à cura e todos estão associados a potenciais efeitos colaterais (TREMBARH *et al.* 1997). Dentre os tratamentos de formas severas de psoríase, o PUVA (Psoraleno Ultra Violeta A) foi associado com maior taxa de remissão de lesões seguido pelo Ultra violeta B (UVB) e pela Ciclosporina A. Taxas menores de remissão foram obtidas com retinóides, com menor incidência de efeitos colaterais, basicamente, irritabilidade mucocutânea. (SPULS *et al.*, 1997 e BRUNER *et al.*, 2003). A Vitamina D tem sido o principal tratamento para casos leves a moderados de psoríase, correspondendo há 50% de todas as drogas usadas (ADORINI, 2002).

### **Fisiopatogenia**

A psoríase é doença multifatorial. De sua gênese participam fatores ambientais, genéticos, imunológicos e de sinalização entre vários tipos celulares dentre os quais as células apresentadoras de antígeno (APC), linfócitos T CD4<sup>+</sup> e queratinócitos, cuja proliferação e maturação são responsáveis pela exteriorização clínica da doença.

LOMHOLT nas ilhas Faeroe em 1963 e HELLGREEN, na Suécia em 1967, conduziram grandes estudos populacionais epidemiológicos, que demonstram bases genéticas para a psoríase (ELDER *et al.*, 1994). Ambos os estudos revelaram substancial diferença no acometimento, em pessoas que apresentavam parentesco com portadores de psoríase quando comparadas à população geral, com uma penetrância estimada em 60%. A comparação entre gêmeos revelou concordância maior nos monozigóticos, com uma herdabilidade calculada de

91%. Estudos de imprinting genômico mostraram uma penetrância significativamente maior quando o pai era o afetado ou provável portador do gene (ELDER *et al.*, 1994; TRAUPE, 1995).

Na região 6p21.3 (PSOR1) foi encontrado um locus de susceptibilidade a psoríase (TREMBATH *et al.*, 1997; ENLUND *et al.*, 1999 e ELDER *et al.*, 2001) que se encontra nas proximidades do Antígeno de Histocompatibilidade do tipo II HLA-Cw6 (ELDER *et al.*, 1994) e do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), parecendo ter relação com o início da doença em idade precoce (LUSZCZEK *et al.*, 2002) e com o risco aumentado para artropatia (GLADMAN *et al.* 1999). Alguns autores, porém, não encontraram tal associação em seus estudos (TOMFOHRDE *et al.* 1994).

Há evidências do envolvimento de outros genes: 1) no final do braço longo do cromossomo 17, PSOR 2 (TOMFORHDE *et al.*, 1994; ELDER, 1995; ENLUND *et al.*, 1999 e ELDER *et al.* 2001) 2) do PSOR 4, na região 1q21 que corresponde à região do complexo de diferenciação epidérmica (CDE), um cluster composto de, pelo menos, 25 genes envolvidos na diferenciação terminal da epiderme humana (CAPON *et al.*, 2001; ELDER *et al.*, 2001) e 3) outros *loci* com relação não tão bem estabelecida, PSOR 5 a PSOR 7.

A partir desses estudos, concluiu-se que a herança genética na psoríase deve estar relacionada a um ou dois genes principais, além do gene próximo ao HLA, o que ficou conhecido com "HIPÓTESE OLIGOGÊNICA" (ELDER *et al.*, 1994). Um desses genes, sendo responsável pelo imprinting, cujo principal mecanismo parece ser uma permutação instável (TRAUPE, 1995). Esse mecanismo é explicado devido ao fato da espermatogônia passar por várias divisões mitóticas até originar um espermatozóide, o que pode acarretar mutação em algum gene instável, diferentemente da ovogônia que fica "congelada" na primeira divisão meiótica até o momento da ovulação, sendo por isso menos susceptível à mutações em genes instáveis.

A observação de que pacientes submetidos a transplante singênico de medula óssea, proveniente de doadores com psoríase, passaram a apresentar lesões características da patologia e que o uso de drogas imunossupressoras como a ciclosporina e, mais recentemente, de inibidores específicos de linfócitos T leva à melhora dessas lesões, apontaram para implicação dos Linfócitos T na gênese da doença (BAKER & FRY, 1992; LEBWONHL, 2003).

Aparentemente, o envolvimento imunológico inicia-se quando antígenos não identificados causam a maturação das células apresentadoras de antígeno (APC) da pele (Células de Langerhans ou dendríticas) que, então, migram para linfonodos regionais. Nos linfonodos, essas células interagem com linfócitos T imaturos, resultando em sua ativação. Este processo requer pelo menos dois sinais: (1) a interação do antígeno da APC com o receptor do linfócito T e (2) sinal co-estimulatório desencadeado pela APC no Linfócito T, podendo incluir interações do tipo CD11a/CD18 (Lymphocyte function-associated antigen – LFA) com CD54 (Intercellular adhesion molecule – ICAM 1), CD28 com B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), CD2 com CD58 (LFA-3) e CD40L com CD40 (GOTTLIEB & BOS 2002).

Uma vez que a Interação entre linfócitos T e APC ocorre, os linfócitos T proliferam, atingem a circulação e, eventualmente, extravasam em regiões de pele inflamada. Na derme, a proporção entre linfócitos CD4 e CD8 é maior que a proporção circulante destas células, sugerindo recrutamento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Na epiderme e na derme, esses linfócitos T ativados (CD4<sup>+</sup>) encontram o antígeno específico e passam então a secretar linfocinas do tipo 1 (Th1) particularmente o Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Interleucina 2 e Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), resultando em proliferação e redução da maturação dos queratinócitos e alterações vasculares associadas à psoríase (BAKER & FRY, 1992 e LEBWOHL, 2003). A psoríase parece ser uma doença autoimune Th1 mediada, envolvendo a hiperproliferação de queratinócitos (ADORINI, 2002; SZEGEDI *et al.*, 2003).

A epiderme é, didaticamente, dividida em estratos de células com características próprias, que correspondem à maturação sofrida pelos queratinócitos enquanto migram da camada mais profunda (basal) da epiderme em direção à camada mais superficial (capa córnea) o que dura em média 28 dias. Em seu último estágio de maturação, inicia-se a formação do envelope queratinizado, uma estrutura altamente insolúvel, sintetizada logo abaixo da membrana citoplasmática formada por ligações cruzadas isopeptídicas do tipo  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina entre as proteínas Loricrina, Involucrina e Queratolinina. Essa reação é catalisada por uma enzima denominada Transglutaminase 1 (TGase 1).

Segundo NONOMURA *et al.*, (1993) a expressão da TGase 1 é controlada, no nível transcricional, no estágio de diferenciação terminal dos queratinócitos

não psoriáticos, quando esses se encontram na camada granular. Nos queratinócitos psoriáticos, há expressão precoce da TGase 1 na camada espinhosa supra basal, devido a um controle aberrante deste gene. Redução na quantidade de mRNA da Loricrina também foi observada por outros pesquisadores, em biópsias de pele com psoríase (TAKAHASHI *et al.*, 1995).

### O Receptor de Vitamina D

No organismo o 7-deidrocolesterol, precursor do colesterol, sofre fotólise induzida pela fração ultravioleta da luz solar (290-300 nm) na pele, transformando-se em pré-vitamina D3, colecalciferol, ou produtos inertes que são inativos e eliminados do organismo; passa à circulação atingindo o fígado, onde sofre uma hidroxilação, transformando-se em 25 hidroxicolecalciferol. Ao atingir os rins, sofre nova hidroxilação, tornando-se 1,25 dihidroxicolecalciferol ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), forma ativa da vitamina D3 Figura 3 (BRAUNWALD *et al.*, 2001).

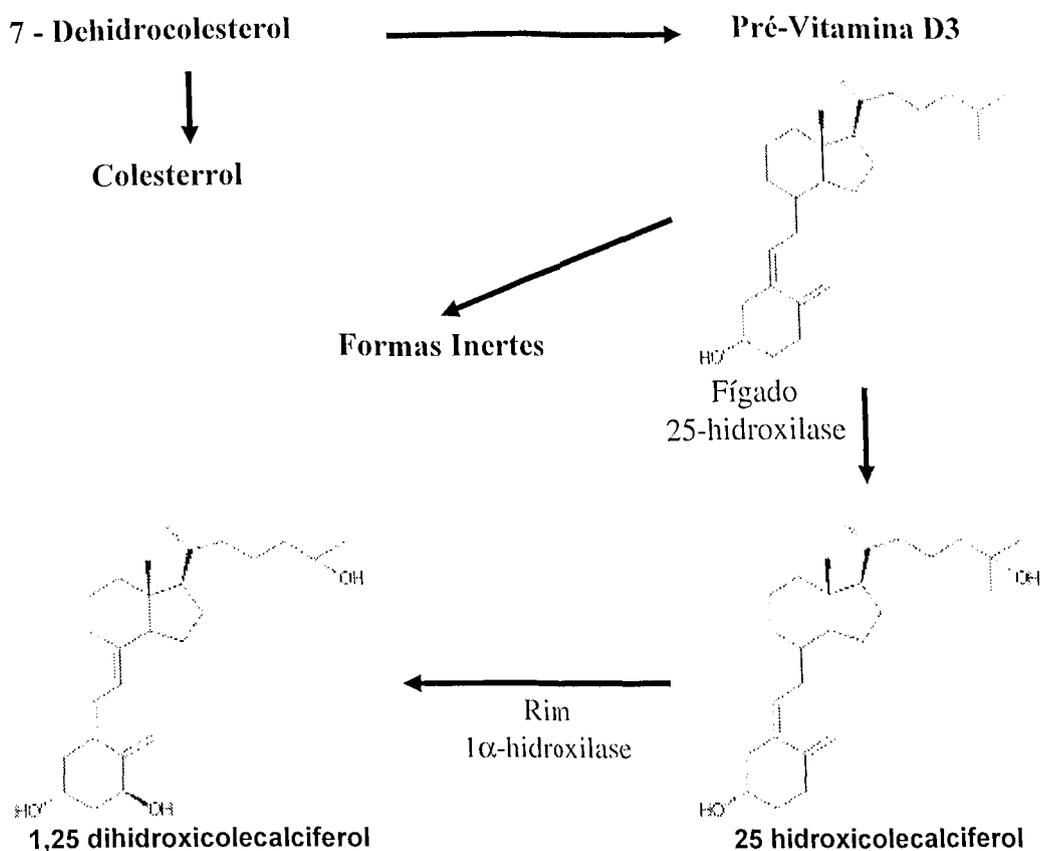


Figura 3 - Via metabólica da vitamina D (Figura compilada de BRAUNWALD *et al.*, 2001)

A vitamina D atua nas células por meio de mecanismos nucleares que envolvem a modificação da transcrição gênica e não nucleares, que envolvem a sinalização celular. Em seu mecanismo de ação não nuclear, a vitamina D promove um aumento de dois segundos mensageiros, o trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG) levando a influxo intracelular de cálcio que pode atuar, diretamente, em reações dentro da célula ou se tornar um outro segundo mensageiro (VAN DE KERKHOFF, 1995).

A presença do receptor de Vitamina D (VDR) foi identificada em vários tipos celulares, com ocorrência nas células APC, Células dendríticas, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (ADORINI, 2002) e Queratinócitos.

A diferenciação epidérmica, a formação do envelope cornificado e a transcrição da transglutaminase são aceleradas pela vitamina D, ações essas mediadas tanto pelo mecanismo nuclear quanto pelo não nuclear. Estudos *in vivo* com vários análogos de vitamina D, desenvolvidos até o momento por meio de modificações estruturais da molécula, mostraram que é possível dissociar o efeito anti-proliferativo da atividade indutora de diferenciação celular (VAN DE KERKHOFF, 1995).

O VDR foi isolado pela primeira vez, após transfecção de células COS-1 com seqüências de cDNA que foram isoladas de intestino humano. O gene para o VDR (*vdr*) localiza-se no cromossomo 12qcen-q12, contém 14 exons, se estende por 75Kb e tem entre 50 e 60 Kda (BAKER *et al.*, 1988). Os Exons IA a IF codificam para região 5' não transcrita, os Exons II e III codificam para o domínio de ligação ao DNA e os Exons IV a IX codificam para a região de ligação à vitamina D (ZMUDA, CAULEY & FERRELL, 2000). O produto da tradução é uma seqüência de 427 aminoácidos, com 2 domínios funcionais, de alta homologia com os receptores de hormônios esteróides. O domínio de ligação ao DNA é altamente conservado e consiste de dois motivos de Zinc-Finger. O domínio de ligação à vitamina D é composto de 12  $\alpha$ -hélices com algumas poucas seqüências  $\beta$  que formam um "bolso" tridimensional lipofílico. A seqüência de aminoácidos nesse domínio de ligação é altamente conservada nas espécies e é responsável pela heterodimerização com o receptor de retinóides (RXR).

As seqüências de DNA que respondem ao VDR são chamadas de Elementos Responsíveis à Vitamina D (VDRE) que consistem de dois meio elementos de seis pares de bases espaçados por três nucleotídeos (DR3).

Uma vez no citoplasma da célula, a vitamina D entra em contato com o VDR. A ligação da Vitamina D com o VDR induz mudanças estruturais que promovem heterodimerização com o receptor de retinóides (RXR) e recrutamento de proteínas co-ativadoras de receptor nuclear, que induzem a remodelação da cromatina e recrutamento de componentes chaves na iniciação da transcrição em seqüências promotoras (ADORINI, 2002). Tem sido encontrados VDR e RXR $\alpha$ , funcionais e em concentrações normais na pele de pacientes sadios e acometidos por psoríase (JENSEN *et al.*, 1998).

CHEN *et al.*, (1996) mostraram um aumento de 2,3 vezes na expressão do mRNA do gene *vdr* em pacientes tratados com 1,25 $\alpha$ (OH) $_2$ D $_3$ , correlacionando a expressão desse gene à melhora clínica da lesão psoriática. Os pacientes tratados com 1,25 $\alpha$ (OH) $_2$ D $_3$  podem ser divididos em dois grupos: um grupo que responde ao tratamento com aumento da expressão do mRNA e um outro grupo, que não responde ao tratamento, no qual não foi evidenciado aumento nas concentrações de mRNA, sugerindo que o efeito terapêutico da Vitamina D esteja correlacionado à indução de aumento nas concentrações de mRNA do gene *vdr* (JENSEN *et al.*, 1998)

A exposição à luz Ultra Violeta B (UVB) causa redução precoce na quantidade de mRNA do *vdr* ou seja, redução na expressão do gene. Esse efeito, provavelmente, se deve a um feedback que indisponibiliza, temporariamente, o *vdr* limitando a responsividade da pele à vitamina D, uma vez que, neste momento a pele está sintetizando a vitamina D (COURTOIS *et al.*, 1998).

A Vitamina D tem a habilidade de mudar o padrão de expressão de linfocinas das células T CD4 $^+$  de Th1 para Th2, sendo que nos genes que codificam essas linfocinas, principalmente Interleucina 2 (IL-2) e TNF- $\alpha$ , foram encontrados elementos tipo VDRE (ADORINI, 2002).

## Polimorfismo do gene *vdr*

Pelo menos 22 mutações, com perda de função, foram descritas para o gene *vdr*. As três mutações investigadas no presente estudo estão mostradas na Figura 4.

No Exon II, na posição 5', a presença de um polimorfismo de transição T/C (ATG para ACG) no primeiro de dois potenciais sítios de iniciação de transcrição, foi definida utilizando-se a enzima de restrição **Fok I**. Essa transição cria um códon de iniciação alternativo três códons adiante do códon original. Indivíduos com o alelo C (designado F) iniciam a transcrição no segundo sítio ATG e perdem os três aminoácidos NH<sub>2</sub> terminal da proteína completa, em comparação com os portadores do alelo T (designado f) que iniciam a transcrição no primeiro ATG e sintetizam a proteína completa com 427 aminoácidos. As frequências de ff (forma completa com 427 aminoácidos) são de 4% entre afro-americanos e 13 – 18% entre asiáticos e caucasianos (ZMUDA, CAULEY & FERRELL, 2000; SAEKI *et al.*, 2002).

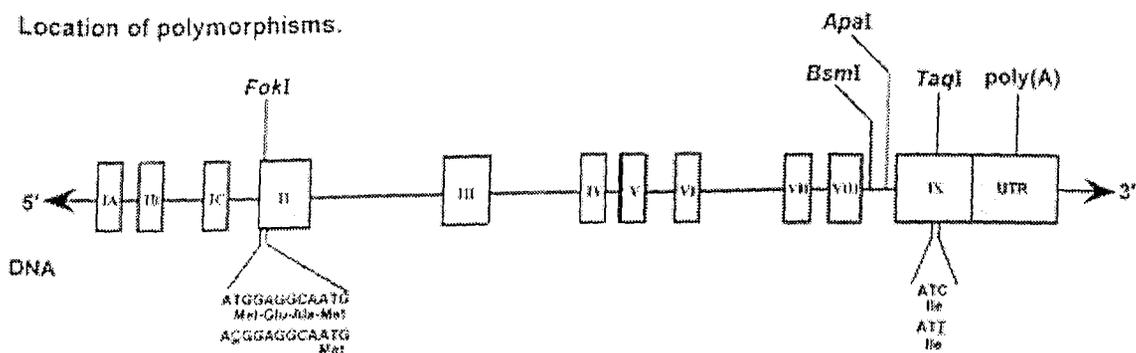


Figura 4 - Principais sítios de polimorfismo do gene VDR.  
(Figura compilada de ZMUDA, CAULEY & FERRELL 2000)

No Intron VIII, separando os Exons VIII e IX, aparece o polimorfismo definido como **Bsm I** que está associado à redução dos níveis plasmáticos da Vitamina D. A frequência genotípica do alelo bb é de 2% entre asiáticos, 5% em afro-americanos e 17% entre caucasianos (ZMUDA, CAULEY & FARRELL, 2000).

No Exon IX, uma substituição de um T por C no códon 352, gera um polimorfismo que não altera a seqüência de aminoácidos do VDR, pois esta substituição sinônima transcreve um mesmo aminoácido, isoleucina. Este polimorfismo é detectado pela enzima **Taq I**, que pode estar associado à redução da estabilidade do mRNA do gene *vdr*. A freqüência do genótipo **Taq** nestas populações é semelhante à freqüência do genótipo **Bsm I**.

Para ZMUDA, CAULEY & FARRELL (2000) o polimorfismo **Bsm I** não tem conseqüências funcionais pois se localiza em um Intron, não está próximo à interface Exon – Intron para causar erros de *splicing*, sendo que vários trabalhos mostram a presença de proteínas semelhantes estrutural e funcionalmente. No entanto, alguns Introns, podem, em determinadas regiões do genoma, assumir papel de Exon, passando a codificar proteínas e expressar genes antes não expressos e, ainda, podem estar em região crítica e fundamental para ocorrência de *splicing*, o que prejudica o correto processamento de mRNA, levando à diminuição dos níveis plasmáticos de vitamina D.

Da mesma forma, é improvável que o polimorfismo do **Taq I** cause efeito direto na função do VDR uma vez que ambos os alelos codificam para isoleucina no aminoácido 352.

Os alelos **Bsm I** e **Fok I** não parecem estar em desequilíbrio de Linkage, embora uma forte concordância exista entre a ausência do **Bsm I** (alelo B) e a presença de **Taq I** (alelo t) (ZMUDA, CAULEY & FARRELL 2000).

## Objetivos

- Estudar os polimorfismos Fok I, Taq I e Bsm I do gene do Receptor da Vitamina D (vdr) em biópsias de pele de pacientes portadores de psoríase e comparar a distribuição desses polimorfismos em sangue periférico de pessoas não acometidas por psoríase da população geral.
- Correlacionar o polimorfismo do gene vdr com Índices de Gravidade da doença.

## Justificativa

A psoríase não é doença associada a menor sobrevivência dos pacientes, mas as manifestações são desagradáveis e resultam em impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes. Embora as lesões tenham caráter benigno, são estigmatizantes, fazendo com que o portador de lesões acabe por se afastar de atividades sociais, o que provoca embotamento social, piora do quadro clínico e aparecimento de co-morbidades associadas.

Dados do *National Psoriasis Foundation* (NPF) relatam nos Estados Unidos da América do Norte (EUA) cerca de 2.1% da população com psoríase, o que significa 4,5 milhões de americanos entre homens, mulheres e crianças. Mais de 1,5 milhões apresentam doença severa, considerada por acometimento de mais de 3% da superfície corpórea (NPF 2003). Setenta e cinco por cento dos pacientes com psoríase moderada a severa, relatam impacto de moderado a grande nas atividades diárias e cerca de sete a 10% dos pacientes entre 35 e 54 anos já pensaram em suicídio por causa dessa doença (baseado nos resultados do National Psoriasis Foundation 2001 Benchmark Survey of psoriasis and Psoriatic Arthritis – disponível no Site: [www.psoriasis.org](http://www.psoriasis.org) em 20/06/2003)

Nos EUA, psoríase é considerada patologia passível de dispensa do serviço militar obrigatório. Em média, são perdidas 56 milhões de horas de trabalho por ano, 350 pessoas morrem, por ano, por patologias associadas ao tratamento da psoríase e 400 são aposentadas. O custo anual de tratamento fica ao redor de 3 bilhões de dólares com cerca de 2,4 milhões de consultas anuais ao dermatologista.

Recentes trabalhos relatam maior incidência de neoplasias de pele em pacientes com psoríase, o que torna necessário uma vigilância mais próxima desses pacientes.

## Capítulo I – Análise do polimorfismo do gene *vdr* e Psoríase.

### Resumo

Estudamos o polimorfismo do gene do receptor da vitamina D, através de reações de RFLP com enzimas de restrição específicas **Taq I**, **Fok I** e **Bsm I**, em biópsias de pele de pacientes com psoríase comparando-os a amostras de sangue periférico de pessoas não acometidas e sua relação com índices de gravidade. Usou-se para tal, o teste de regressão logística e o teste exato de Fisher. Os polimorfismos foram definidos como “**T**”, “**B**” e “**F**” quando as seqüências amplificadas não apresentavam os sítios de restrição e como “**t**”, “**b**” e “**f**” se os sítios de restrição estavam presentes. As freqüências alélicas no grupo controle foram: **13(39,4%)FF**, **17(51,5%)Ff** e **3(9,1%)ff**, **12(36,4%)TT**, **16(48,5%)Tt** e **5(15,2%)tt** e **9(29%)BB**, **14(45,2%)Bb** e **8(25,8%)bb**. No grupo de pacientes com psoríase: **3(37,5%)FF**, **4(50%)Ff** e **1(12,5%)ff**, **4(50%)TT**, **2(25%)Tt** e **2(25%)tt** e **1(25%)BB** e **3(75%)bb**. Nas regressões logísticas não houve diferença estatística significativa entre os genótipos do Grupo Controle e o genótipo dos pacientes com psoríase. A análise pelo teste exato de Fisher, foi não significativa para correlação entre genótipos e os índices de gravidade; o que está de acordo com os dados de literatura. Os resultados sugerem que o polimorfismo do gene *vdr* não participa ativamente da gênese da doença e que alterações encontradas em alguns grupos populacionais podem refletir o “efeito fundador”.

## **Abstract**

Investigation was conducted of polymorphism of the Vitamin D Receptor Gene using RFLP assays with restriction enzymes: **Taq I**, **Fok I** and **Bsm I**. Skin biopsies from psoriasis patients were compared with blood samples from non-psoriasis persons using an index of severity. The Fisher Test and logistic regression were applied to determine significance. Instances of polymorphism were defined: "T", "B" and "F" if amplified sequences did not present restriction sites and "t", "b" and "f" if such sites were detected. The Allele frequencies in the control group were: **13** (39,4%) **FF**, **17** (51,5%) **Ff** and **3** (9,1%) **ff**; **12** (36,4%) **TT**, **16** (48,5%) **Tt** and **5** (15,2) **tt** and **9** (29%) **BB**, **14** (45,2%)**Bb** and **8** (25,8%)**bb**. Results for the patient group were: **3** (37,5%) **FF**, **4** (50%) **Ff** and **1** (12,5%) **ff**; **4** (50%) **TT**, **2** (25%) **Tt** and **2** (25%) **tt** and **1** (25%) **BB** and **3** (75%) **bb**. Logistic regression did not reveal significant differences between group genotypes. Nor did Fisher's test disclose significant association between genotypes and the severity index. These findings were in agreement with the international literature. Our conclusion was that *vdr* polymorphism is not associated with the genesis of psoriasis and differences between some population groups may be due to the "founding effect".

## **Material e Métodos**

### **Pacientes e obtenção de amostras.**

As amostras de pele foram coletadas por biópsia com *Punch* segundo normas cirúrgicas, após anti-sepsia e anestesia local com *xylocaína* a 2%, de pacientes do Hospital de Clínicas de Uberlândia, Uberlândia – MG e pacientes da Clínica Dermatológica da Dra Lílian Emiko Kato que, gentilmente, colaborou na obtenção e coleta das amostras. Os fragmentos foram retirados de regiões que trariam pequeno efeito inestético, respeitando as bordas da lesão. Logo após a biópsia, os fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e encaminhados ao Laboratório de Genética / UFU onde foram acondicionados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

10 (dez) amostras foram usadas para análise, sendo 8 (oito) amostras de pacientes com psoríase e 2 (duas) amostras Controle, sem doença de pele. Uma amostra foi excluída por apresentar, o paciente, associação de psoríase e positividade para o vírus HIV.

O grupo Controle foi constituído de amostras de sangue periférico coletadas e analisadas para o polimorfismo do *vdr*, a partir de pacientes sem doença de pele e, gentilmente, cedidos pela mestranda Juliana Almeida Cobo. A escolha destes pacientes foi realizada mediante entrevista pessoal da pesquisadora, com os indivíduos, sendo excluídos os que apresentavam relato de doença de pele como psoríase ou melanoma em si mesmos ou em parentes.

O sangue periférico foi coletado em tubo tipo “Vacutainer” em presença de Ácido-Etileno-Diamino-Tetraacético (EDTA), por meio de punção de veia braquial após assepsia com álcool iodado e acondicionado em geladeira à  $8^{\circ}\text{C}$  até manipulação.

As técnicas de manipulação do material biológico seguiram normas do Código de Ética Médica, sendo os pacientes identificados por seus números de prontuários.

Todos os pacientes assinaram termo de Consentimento Informado e Voluntário (Anexo I) de acordo com normas do Código de Ética Médica aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia – UFU (Anexo II).

Os diagnósticos de psoríase foram feitos em bases clínicas por dois profissionais médicos distintos, uma vez que o diagnóstico desta patologia é feito em bases clínicas. O índice de gravidade de lesões PASI (Psoriasis Area and Severity Index) foi calculado em conformidade ao descrito no (Anexo III) dados de história familiar e época de início da patologia foram coletados diretamente com os pacientes, durante consulta médica.

Foram analisadas um total de 10 (dez) amostras de fragmentos de pele, 2 (dois) controles e 8 (oito) pacientes com psoríase, e 31 amostras de sangue periférico de pacientes sem patologias de pele (grupo controle).

### **Extração de DNA**

O DNA de fragmentos de pele e sangue periférico foi extraído segundo SAMBROOK *et al.*, (1989) com otimizações feitas no Laboratório de Genética Molecular – UFU (Anexo V), e cedidos gentilmente pelos Professores Dr Luiz Ricardo Goulart Filho e Waldesse Pirajé.

O DNA foi analisado em gel de Agarose 1,5% após coloração com Brometo de Etídeo (0,5ug/ml) e visualizado sob luz UV em VDS Image Master (PHARMACIA).

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

As amostras foram amplificadas em Termociclador MJ RESEARCH INC PTC-100 com os seguintes reagentes: 1,5U de Taq DNA polimerase, Tampão da Taq Polimerase 1x (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH8,3), 200µM de cada dNTP (Trifosfato de desoxirribonucleotídeos), 7pmoles de cada Primer (Tabela 1), 200ng de DNA genômico e H<sub>2</sub>O ultra pura qsp 25µl.

As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, 38 ciclos consecutivos a 94°C por 40 segundos, 59°C por 40 segundos e 72°C por 60 segundos, seguido por um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

**Tabela 1- Seqüências de primers utilizados nas reações de amplificação para TaqI, FokI e BsmI e Tamanho dos Fragmentos esperados na amplificação**

| Primers                    | Seqüência 5'- 3'               | Tamanho do fragmento |
|----------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Taq I Direto <sup>1</sup>  | CAGAGCATGGACAGGGAGCA           | 352 bp               |
| Taq I Reverso <sup>1</sup> | GGTGGCGGCAGCGGATGTACGT         |                      |
| Fok I Direto <sup>2</sup>  | AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT    | 265 bp               |
| Fok I Reverso <sup>2</sup> | ATGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC     |                      |
| Bsm I Direto <sup>3</sup>  | AACCAGCGGAAGAGGTCAAGGG         | 825 bp               |
| Bsm I Reverso <sup>3</sup> | CAACCAAGACTCAAGTACCGCGTCAAGTGA |                      |

1 – Ferreira, 2002  
 2 – Hutchinson *et al.*, 2000  
 3 – Morrison *et al.*, 1994

### Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Os ensaios de restrição enzimática com os produtos de amplificação foram feitos com as enzimas **Taq I**, **Bsm I** e **Fok I** (Anexo IV). Os alelos T/t; B/b e F/f foram separados eletroforicamente em gel de agarose 1,5% com 2µl de *Loading dye* (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 40% sacarose) sob tensão constante de 150 volts por 60 a 90 minutos em tampão TBE 0,5x. Foram corados com Brometo de Etídio e visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador e foto documentados em sistema *VDS-Imagesystem* (Pharmacia).

O polimorfismo do gene *vdr* foi descrito como "T", "B" e "F" quando as seqüências amplificadas não apresentavam os sítios de restrição e como "t", "b" e "f" quando o sitio de restrição estava presente.

### Análise Estatística

Utilizou-se o modelo de Regressão Logística para analisar diferenças na distribuição dos genótipos dentro dos grupos Controle e Afetados com Psoríase, assim como para analisar diferenças entre os Índices de Gravidade e os Genótipos, uma vez que esse modelo permite avaliar a distribuição de cada par de alelos nos grupos em questão.

Adotou-se o nível de significância de 0,05.

## Resultados

As ampliações obtidas para os fragmentos do gene *vdr* que envolvem os polimorfismos **Taq I**, **Fok I** e **Bsm I**, estão apresentadas nas figuras 4 a 6. Os produtos de amplificação do gene *vdr* foram submetidos à digestão enzimática, conforme protocolo específico (ANEXO IV) e os resultados foram dados como: **T**, **F**, e **B** para os alelos sem sítios de mutação (tipo selvagem, sem mutação) e **t**, **f**, e **b** para os alelos com sítios para as enzimas de restrição.

O material genético obtido foi amplificado pelos *primers* apresentados na Tabela 1 segundo HUTCHINSON *et al.*, (2000) e digeridos pela enzima **Fok I**. Os alelos foram dispostos de acordo com o tamanho do fragmento gerado, permitindo sua identificação em **F** (265 bp) e **f** (196 bp e 69 bp) (Figura 5).

No grupo Controle as freqüências alélicas foram: 13 (39,4%) FF, 17(51,5%) Ff e 3 (9,1%) ff (Anexo VII). No grupo de Pacientes com Psoríase as freqüências alélicas observada foram: 3 (37,5%) FF, 4(50%) Ff e 1(12,5%) ff.

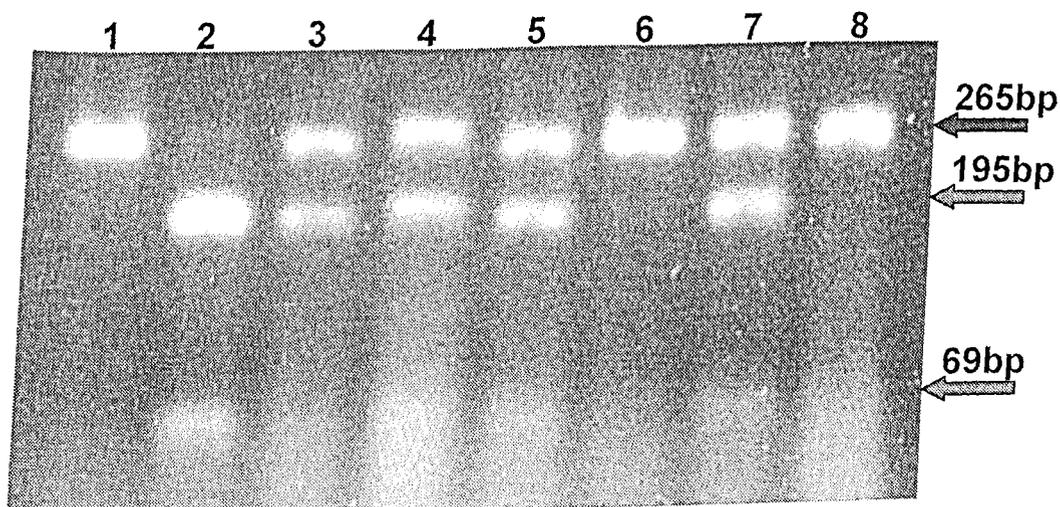


Figura 5 – Padrão eletroforético obtido por restrição enzimática do fragmento **Fok I** com a enzima **Fok I** no grupo de pacientes com Psoríase.

- 1, 6 e 8 – FF;
- 2 – ff;
- 3, 4, 5 e 7 – Ff

Para a enzima **Taq I**, o material genético obtido foi amplificado pelos *primers* apresentados na Tabela 1. Os alelos foram dispostos de acordo com o tamanho do fragmento gerado, permitindo sua identificação em **T** (352 bp) e **t** (293 bp e 59 bp). No grupo controle, suas freqüências alélicas foram: 12(36,4%) TT, 16 (48,5%) Tt e 5 (15,2) tt (Anexo VII). E o grupo de pacientes com psoríase a freqüência alélica observada foi: 4(50%) TT, 2(25%) Tt e 2 (25%) tt (Figura 6)

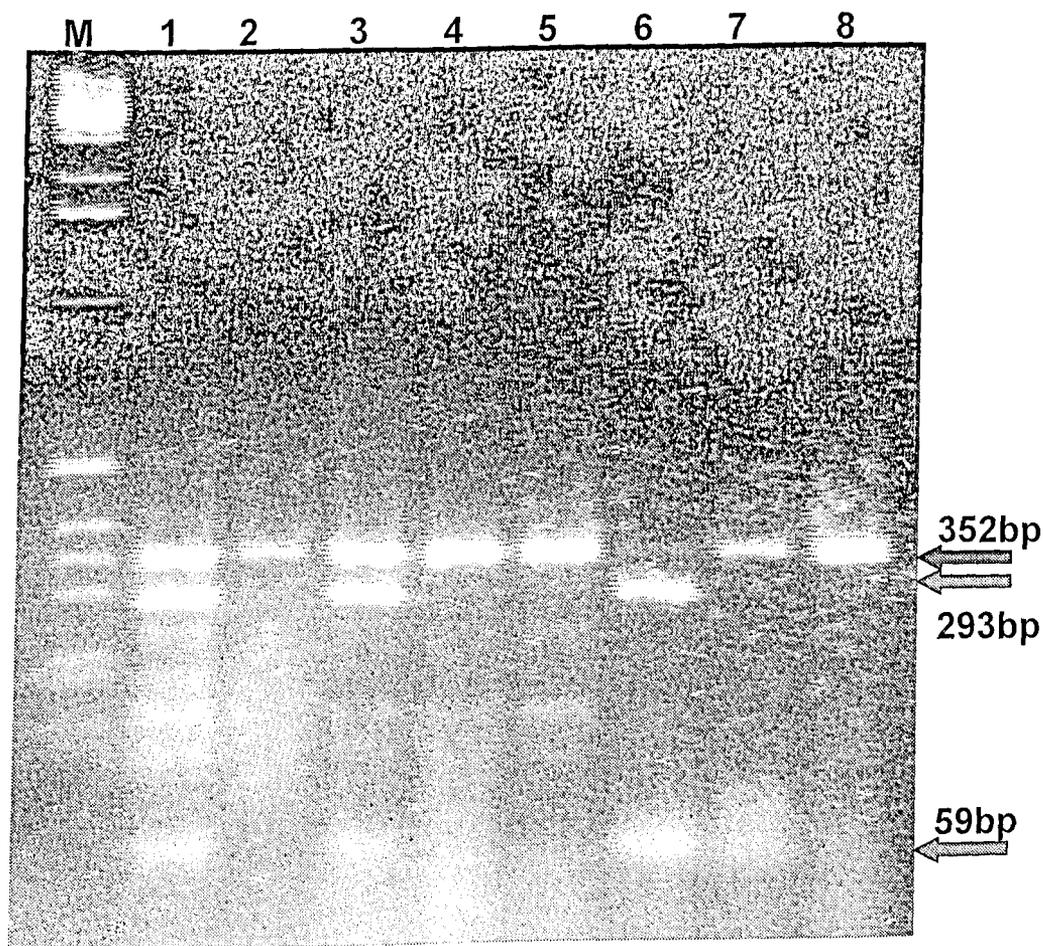


Figura 6 - Padrão eletroforético obtido por restrição enzimática do fragmento Taq I com a enzima Taq I no grupo de pacientes com Psoríase.

1 e 3 – Tt

6 – tt

2, 4, 5, 7 e 8 – TT

M – Marcador de Peso Molecular (1000bp)

O material genético para **Bsm I**, foi amplificado pelos *primers* (Tabela 1). Os alelos foram dispostos de acordo com o tamanho do fragmento gerado, permitindo sua identificação em **B** (825 bp) e **b** (650 bp e 175 bp). No grupo Controle, as freqüências alélicas foram: 9(29%) BB, 14(45,2%) Bb e 8 (25,8%) bb (Anexo VII). E no grupo de Pacientes com Psoríase as freqüências alélicas observadas foram: 1 (25%) BB e 3(75%) bb. (Figura 7).

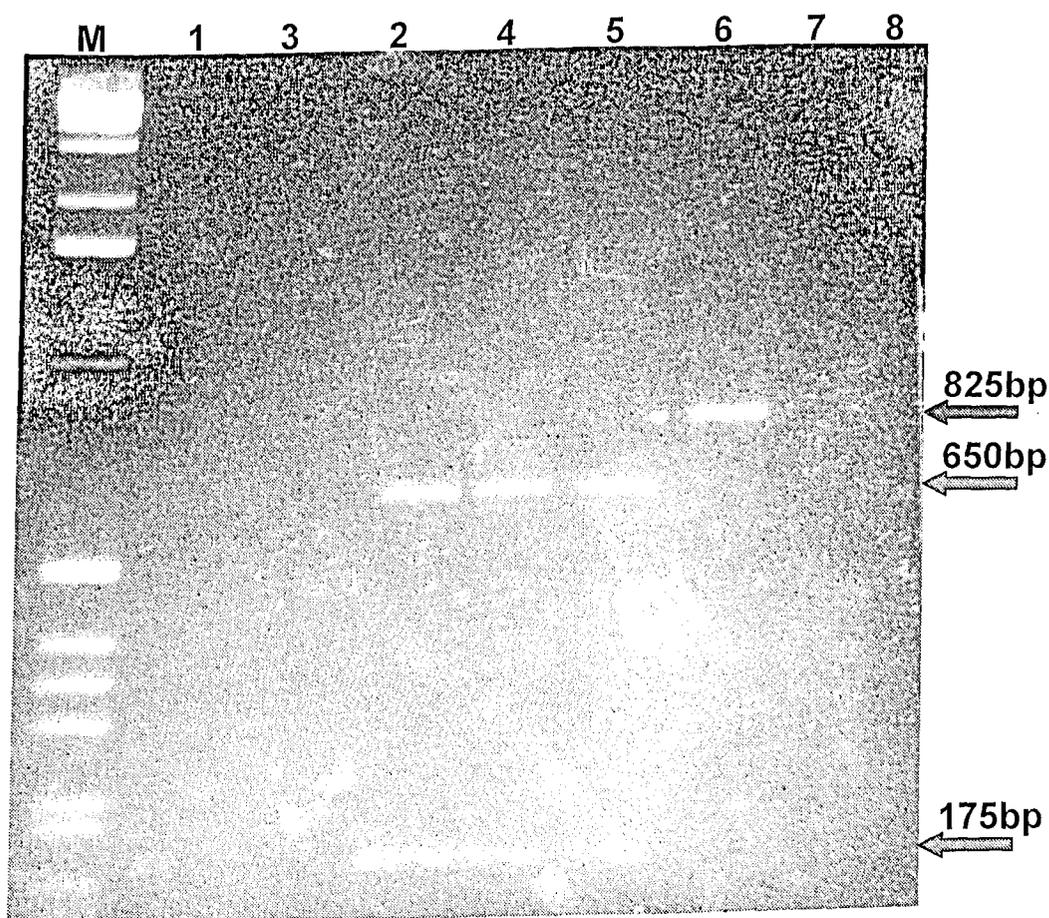


Figura 7 - Padrão eletroforético obtido por restrição enzimática do fragmento Bsm I com a enzima Bsm I no grupo de pacientes com Psoríase.

2, 4 e 5 - bb

6 - BB.

M - Marcador de Peso Molecular de (1000bp)

Os genótipos encontrados estão relacionados nas Tabelas 2, 3 e 4 em função da enzima de restrição empregada usada.

Tabela 2 - Frequência dos genótipos Taq I nos grupos controle (Cont) e Psoríase (Pso)

|           | Taq I |      |     |     |
|-----------|-------|------|-----|-----|
|           | Cont  |      | Pso |     |
|           | n     | %    | n   | %   |
| <b>TT</b> | 12    | 36,4 | 4   | 50  |
| <b>Tt</b> | 16    | 48,5 | 2   | 25  |
| <b>tt</b> | 5     | 15,1 | 2   | 25  |
|           | 33    | 100  | 8   | 100 |

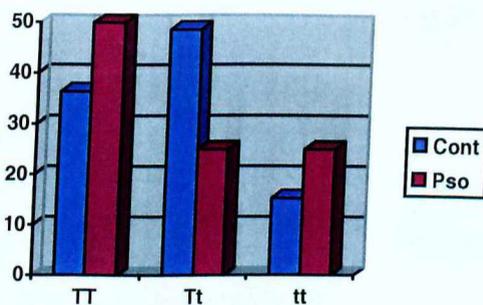


Tabela 3 - Frequência dos genótipos Fok I nos grupos controle (Cont) e Psoríase (Pso)

|           | Fok I |      |     |      |
|-----------|-------|------|-----|------|
|           | Cont  |      | Pso |      |
|           | n     | %    | n   | %    |
| <b>FF</b> | 13    | 39,4 | 3   | 37,5 |
| <b>Ff</b> | 17    | 51,5 | 4   | 50   |
| <b>ff</b> | 3     | 9,1  | 1   | 12,5 |
|           | 33    | 100  | 8   | 100  |

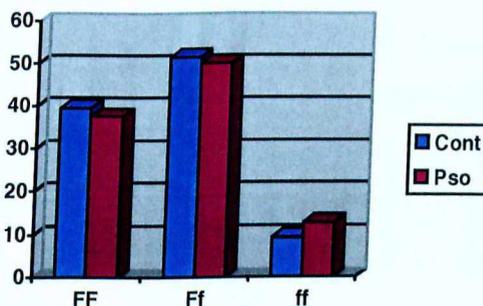
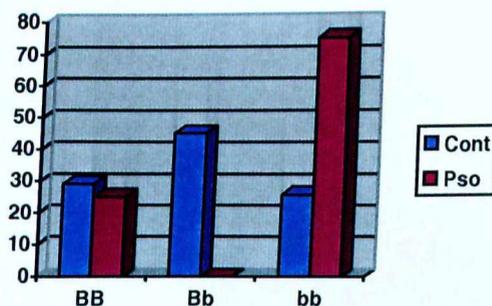


Tabela 4 - Frequência dos genótipos Bsm I nos grupos controle (Cont) e Psoríase (Pso)

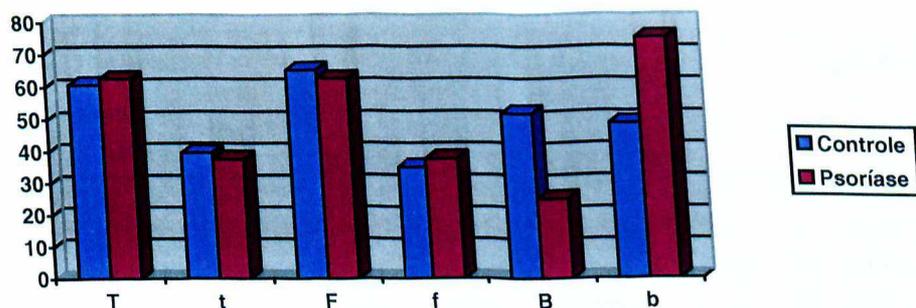
|           | Bsm I |      |     |     |
|-----------|-------|------|-----|-----|
|           | Cont  |      | Pso |     |
|           | n     | %    | n   | %   |
| <b>BB</b> | 9     | 29   | 1   | 25  |
| <b>Bb</b> | 14    | 45,2 | 0   | 0   |
| <b>bb</b> | 8     | 25,8 | 3   | 75  |
|           | 31    | 100  | 4   | 100 |



As frequências Alélicas estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Frequências dos alelos T e t, F e f e B e b entre Controles e Pacientes com Psoríase

|           | T     | t     | F     | f     | B     | b     |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Controles | 60,65 | 39,35 | 65,15 | 34,85 | 51,60 | 48,40 |
| Psoríase  | 62,50 | 37,50 | 62,50 | 37,50 | 25,00 | 75,00 |



Foi realizada análise de Regressão Logística, comparando cada genótipo com a presença ou não de lesões, para verificar a hipótese de que algum dos polimorfismos pudesse estar associado à presença da doença. Nas Regressões Logísticas não houve diferença estatisticamente significativa entre o genótipo do grupo de pessoas não acometidas e o genótipo dos pacientes com psoríase. Os dados estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Estimativa dos parâmetros de regressão Logística para os polimorfismos Taq I, Fok I e Bsm I

|                       | Fok I | Taq I | Bsm I |
|-----------------------|-------|-------|-------|
| $\beta 1$             | -0,13 | 0,07  | -0,99 |
| p                     | 0,83  | 0,89  | 0,18  |
| Odds Ratio            | 0,87  | 1,07  | 0,36  |
| <b>p - Valor de p</b> |       |       |       |

Os fatores de gravidade estão relacionados na Tabela 7. Considera-se grave, acometimento de superfície corporal maior que 3% (NPF) e, como era de se esperar, a superfície corporal guarda relação direta com o índice PASI, uma vez que o mesmo se relaciona à área corpórea afetada.

**Tabela 7 - Tabela descritiva de Pacientes, Índices de Gravidade e Genótipos para polimorfismo do Gene VDR**

| Dados dos Pacientes |          |              |      | Índices de Gravidade  |                   |                               |      | Genótipo |     |     |
|---------------------|----------|--------------|------|-----------------------|-------------------|-------------------------------|------|----------|-----|-----|
| Paciente            | Identif. | Idade (anos) | Sexo | Idade início Sintomas | História Familiar | Superfície Corporal Acometida | PASI | Fok      | Taq | Bsm |
| PP_001              | MVSB     | 53           | Fem  | 25                    | Sim               | <10%                          | 1,9  | FF       | Tt  | --- |
| PP_002              | TLS      | 44           | Fem  | 30                    | Não               | <10%                          | 3,8  | ff       | tt  | bb  |
| PP_003              | LR       | 52           | Masc | 34                    | Não               | >10%                          | 19,3 | Ff       | Tt  | --- |
| PP_004              | WA       | 39           | Masc | 25                    | Não               | >10%                          | 6,7  | Ff       | TT  | bb  |
| PP_005              | MISS     | 45           | Fem  | 36                    | Não               | <10%                          | 3,6  | Ff       | TT  | bb  |
| PP_006              | PFL      | 48           | Masc | 40                    | Não               | <10%                          | 4    | FF       | tt  | BB  |
| PP_007              | IFN      | 24           | Fem  | 19                    | Sim               | <10%                          | 1,6  | Ff       | TT  | --- |
| PP_008              | VD       | 75           | Masc | 48                    | Sim               | >10%                          | 13,6 | FF       | TT  | --- |

**PASI – Psoriasis Area and Severity Index**  
**Fok, Taq e Bsm – Enzimas de Restrição**

Para testar a hipótese de correlação entre os genótipos encontrados e os índices de gravidade foi realizado o Teste Exato de Fisher, que não mostrou significância entre os mesmos. (Tabela 8).

**Tabela 8 - Tabela com os valores do Teste Exato de Fisher entre cada índice de gravidade e o genótipo do paciente**

|            | IS   | HF   | SC   | PASI |
|------------|------|------|------|------|
| <b>Fok</b> | 0,07 | 0,32 | 0,54 | 0,54 |
| <b>Taq</b> | 0,42 | 0,32 | 0,32 | 0,32 |
| <b>Bsm</b> | 0,25 | 1,00 | 0,75 | 0,75 |

**Fok, Taq e Bsm – Enzimas de Restrição**  
**IS – Idade de Início de Sintomas**  
**SC – Superfície Corporal**  
**HF – História Familiar**  
**PASI – Índice de área e gravidade em Psoríase**

## Discussão

A ação nuclear da vitamina D já foi relacionada a vários tipos celulares, dentre eles, Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no qual sua ação está relacionada à mudança do padrão Th1 para Th2 (ADORINI, 2002) e queratinócitos, nos quais tanto a multiplicação quanto a maturação parecem, sofrer interferências devido a sua presença.

A 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, forma ativa da vitamina D, adicionada a meio de cultura de fibroblastos mostrou-se eficaz em inibir a proliferação dessas células, da mesma forma que seu análogo, a 1-hidroximetil-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>. Esta última, baseado na atividade diferencial, *in vitro*, tem afinidade para o receptor de vitamina D de 0,1% quando comparado a 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, donde se concluiu que o efeito inibidor de proliferação celular pela vitamina D não deve ser reflexo da sua afinidade pelo receptor da vitamina D (VAN DE KERKHOFF, 1995).

A TGase 1 (transglutaminase) uma das enzimas responsáveis pela maturação epidérmica, parece ter sua transcrição amplificada pela vitamina D (VAN DE KERKHOFF, 1995), por ação do seu receptor nuclear, estando diminuída na pele com psoríase (NONOMURA *et al.*, 1993).

Os polimorfismos do gene *vdr* foram discutidos quanto a sua funcionalidade (ZMUDA, CAULEY & FERRELL, 2000). Uma vez que as alterações investigadas pelo polimorfismo **Taq I** é sinônima e corresponde a alteração silenciosa que codifica para o mesmo aminoácido, Isoleucina (Ile) fica difícil correlacionar este polimorfismo como uma alteração morfológica do receptor, chegando a provocar patologia.

Os polimorfismos **Taq I** e **Bsm I** do gene *vdr* não foram correlacionados, nesta investigação, nem em investigações de outros pesquisadores (PARK *et al.*, 1999; OKITA *et al.*, 2002), com predisposição à psoríase, talvez, porque tais polimorfismos sejam silenciosos no produto final (receptor normal) ou porque o aparecimento da doença não esteja relacionada ao efeito nuclear da proteína VDR.

O Polimorfismo **Fok I** altera a porção NH<sub>2</sub> terminal do receptor de Vitamina D, porém não foram encontrados dados na literatura que correlacionem este

polimorfismo com perda da função do Receptor de Vitamina D, em especial relacionados à psoríase, o que foi verificado, também, em nossa análise.

Os resultados da comparação entre os grupos Controle e Pacientes com Psoríase, para o polimorfismo do gene *vdr*, com as enzimas **Taq I**, **Bsm I**, e **Fok I** não foram estatisticamente significativos ( $p=0,89$ ;  $0,18$  e  $0,83$  respectivamente). Não há correlação entre qualquer um dos polimorfismos do gene *vdr* e a presença de psoríase, o que é compartilhado pela literatura, pelo menos, para os polimorfismos **Taq I** e **Bsm I**. SAEKI *et al.*, (2002) no entanto, ao estudarem psoríase vulgar na população japonesa, encontraram maior presença dos alelos **B** e **t** nos pacientes com psoríase.

Desde o início das pesquisas sobre genética em psoríase, os trabalhos mostram que alguns genes em linkage estão associados a maior susceptibilidade à psoríase, porém não foi, até o momento, identificado nenhum gene responsável pela doença (OMIM).

Uma provável explicação para isso é que um gene próximo ao gene *vdr* seja o responsável direto pela doença e o que observamos, na realidade, seja o efeito do linkage desse gene a outros genes mais facilmente detectáveis.

Pode ser que os efeitos benéficos da vitamina D na pele com psoríase não estejam relacionados a sua ação nos sítios VDRE e sim a seu efeito não nuclear, como aumento do cálcio intracelular. Não foi encontrado trabalho na literatura que apoiasse essa teoria, nem tão pouco trabalho que explicitasse o mecanismo de ação da vitamina D nos pacientes com psoríase.

Há, também, evidências de bloqueio pela  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , na transição da fase G1 para S do ciclo celular, por meio de vários mecanismos, tais como, estimulação de proteínas inibitórias como CDK e P21, que contém elementos responsáveis à vitamina D (VDRE) (HUTCHINSON *et al.*, 2000).

Ao que tudo indica, embora a vitamina D tenha ação em vários tipos celulares, o efeito de remissão das lesões parece ser função da redução da resposta imune linfocítica da pele (ADORINI, 2002).

A análise dos polimorfismos do gene *vdr* e sua possível correlação com os índices de gravidade não foi significativa estatisticamente (Teste Exato de Fisher) e tão pouco foi confirmada pela literatura (PARK *et al.*, 1999; OKITA *et al.*, 2002).

A idade precoce de início da doença, com início antes dos 40 anos, caracterizando a psoríase tipo I (idade precoce, maior chance de recidiva, tendência a artropatia) não mostrou diferença estatística (tabela 8) entre grupos Controle e Portadores de Psoríase, pela nossa análise. Os dados de (PARK *et al.*, 1999; OKITA *et al.*, 2002) confirmam isso. Discordância nos resultados de diferentes pesquisadores pode ser devida à distribuição étnica das populações, uma evidência clara do efeito fundador.

Neste estudo, foi analisado um número pequeno de pacientes por falta de disponibilidade de recurso material e temporal para análise mais acurada, porém os resultados parecem ser concordantes com os da literatura nacional e internacional com casuística bastante superior.

Outras análises e estudos são necessários para que se possa concluir sobre a influência e ou definição da Genética da psoríase, embora, pareça não haver dúvidas que ela ocorra.

Esperamos que num futuro próximo, a aquisição de mais dados e a análise desses dados, sob a visão do genoma funcional, possa trazer mais conforto aos pacientes portadores desta patologia, fazendo valer a função do conhecimento humano de minimizar a dor e sofrimento.

## Referências Bibliográficas

- , Vitamin D (2001) in: BRAUNWALD, E; FAUCI, A.S., KASPER, D.L., HAUSER, S.L., LONGO, D.L. & JAMESON, J.L. *Harrison's principles of internal medicine*, 2<sup>a</sup>. ed. Toronto, McGraw-Hill, 2198-2201.
- ADORINI L. (2002) Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. **International Immunopharmacology 2**: 1017 – 1028.
- BAKER, A. R. McDONNELL, D. P. HUGHES, M. CRISP, T. M. MANGELSDORF, D. J. HAUSLER, M. R. PIKES, J. W. SHINE, J. AND O'MALLEY, B. W. (1988) Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. **Proc of Nat Acad Sci 85**: 3294 – 3298.
- BAKER, B.S. & FRY L. (1992) The immunology of Psoriasis. **British Journal of Dermatology 126**: 1-9.
- BRUNER C.R., FELDMAN S.R., VENTRAPRAGADA, M. AND FLEISCHER A.B. JR (2003) A systematic review of adverse effects associated with topical treatment for psoriasis. **Dermatol. Online J. 9(1)**: 2
- CAPON, F. SEMPRINI, S. CHIMENTI, S. FABRIZI, G. ZAMBRUNO, G. MURGIA, S. CARCASSI, C. FAZIO, M. MINGARELLI, R. DALLAPICOLA, B. AND NOVELLI, G. (2001) Fine mapping of the PSORS4 Psoriasis Susceptibility Region on Chromosome 1q21. **J. Invest. Dermatol 116**: 728 - 730
- CHEN L. C. PEREZ, A. SANAN, D. K. HEINRICH, G. CHEN, T. C. AND HOLICK, M.F. (1996) Induction of Vitamin D Receptor mRNA expression in psoriatic plaques correlates with clinical response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. **J. Invest. Dermatol. 106**: 637 – 641.
- COURTOIS, S. SEGAERT, S. DEGREEF, H. BOUILLON, R. AND GARMYN, M. (1998) Ultraviolet B Suppresses vitamin D receptor gene expression in keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications 246**: 64 – 69.

Dave's Psoriasis Information - <http://psorsite.com/index.html>

ENLUND, F. SAMUELSSON, L. ENERBÄCK, C. INEROT, A. WAHLSTRÖM, J. YHR, M. TORINSSON, A. MERTINSSON, T. AND SWANBECK (1999) Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large swedish set of families: confirmation of linkage to chromosome 6p(HLA region), and to 17q, but not to 4q. **Hum. Hered** **49**: 2 – 8.

ELDER, J.T.; NAIR, R.P.; GUO, S.W. HENSELER, T.; CHRISTOPHERS, E. & VOORHESS, J.J. (1994) The genetics of psoriasis. **Arch Dermatol** **130**: 216-224.

ELDER, J.T. (1995) Cytokine and genetic regulation of psoriasis. In: CALLEN, J.P.; DAHL, M.V.; GOLITZ, L.E.; GRENWAY, J.H.T. & SHACNER, L.A. **Advances in Dermatology** **10** ed, St Louis, Mosby: 99-133.

ELDER, J.T. NAIR, R. P. HENSELER, T. JENISCH, S. STUART, P. CHIA, N. CHRISTOPHERS, E. AND VOORHEES, J. J. (2001) The genetics of Psoriasis 2001 – The odyssey continues. **Archives of Dermatology** **137**: 1447 – 1454.

FERREIRA, F.R. (2002). **Associação de fatores genéticos não-HLA com resistência/ suscetibilidade a Hanseníase**. Dissertação de mestrado. Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia.

GLADMAN, D. D. CHEUNG, C. NG. CM. AND WADE J. A. (1999) HLA-C locus alleles in patients with psoriatic arthritis (PsA). **Human Immunology** **60**: 259 – 261.

GOTTLIEB, A. B. AND BOS, J. D. (2002) Short analytical review Recombinantly Engineered Human proteins: transforming the treatment of psoriasis. **Clinical Immunology** **105(2)**: 105-116.

HUTCHINSON, P.E., OSBORNE, J.E., LEAR, J.T., SMITH, A.G., WILLIAN BOWERS, P., MORRIS, P.N., JONES, P.W., YORK, C., STRANGE, R.C. & FREYER, A.A. (2000) Vitamin d receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. **Clinical Cancer Research** **6**: 498 - 506

- JENSEN, T. SØRENSEN, S. SØLVSTEN, H. AND KRAGBALLE, K. (1998) the vitamin D<sub>3</sub> receptor and retinoid X receptor in psoriatic skin: the receptor levels correlate with the receptor binding to DNA. **British Journal of Dermatology** **138**: 225 – 228.
- KAWADA, A. TEZUKA, T. NAKAMIZO, Y. KIMURA, H. NAKAGAWA, H. OHKIDO, M. OZAWA, A. OHKAWARA, A. KOBAYASHI, H. HARADA, S. IGARASHI, A. AND THE JAPANESE SOCIETY FOR PSORIASIS RESEARCH (2003). A survey of psoriasis patients in Japan from 1982 to 2001. **Journal of Dermatological Science** **31**: 59-64.
- LEBWOHL, M. (2003). Psoriasis. **Lancet** **361**: 1197-1204
- LUSZCZEK, W. KUBICKA, W. CISLO, M. NOCKOWSKI, P. MANCZAK, M. WOSZCZEK, G. BARAN, E. AND KUSNIERCZYK, P. (2002) Strong association of HLA-Cw6 allele with juvenile psoriasis in polish patients. **Immunology Letters** **85**: 59-64.
- MARKS, R. BARTON, S. P. SHUTTLEWORTH, D. AND FINLAY, A. Y. (1989) Assessment of disease progress in psoriasis. **Arch Dermatol** **125**: 235 – 240.
- MATHIEU, C. AND ADORINI, L. (2002) The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogs as immunomodulatory agents. **Trends in Molecular Medicine** **8(4)**: 174 – 179.
- MORRISON, N.A. QI, J.C. TOKITA, A. KELLY, P.J. CROFTS, L. NGUYEN, T.V. SAMBROOK, P.N. AND EISMAN, J.A. (1994). Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature**; **367(6460)**: 284-7.
- National Psoriasis Foundation. <http://www.psoriasis.org>
- NONOMURA, K. YAMANISHI, K. HOSOKAWA, Y. DOI, H. HIRANO, J. FUKUSHIMA, S. AND YASUNO, H. (1993) Localization of transglutaminase 1 mRNA in normal and psoriatic epidermis by non-radioactive *in situ* hybridization. **British journal of Dermatology** **128**: 23-28.

OKITA, H. OHTSUKA, T. YAMAKAGE, A. AND YAMAZAKI, S. (2002)  
Polymorphism of the vitamin D3 receptor in patients with psoriasis. **Arch Dermatol Res** **294**: 159-162

OMIM – [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

PARK, B., S., PARK, J., S., LEE, D., Y., YOUN, J., I. AND KIM, I., G. (1999)  
Vitamin D receptor polymorphism is associated with psoriasis. **J Invest. Dermatol.** **112**: 113 – 116.

SAEKI, H. ASANO, N. TSUNEMI, Y. TAKEKOSHI, T. KISHIMOTO. M. MITSUI, H. TADA, Y. TORII, H. KOMINE, M. ASAHIMA, A. AND TAMAKI, K. (2002)  
polymorphisms of vitamin D receptor gene in japanese patients with psoriasis vulgaris. **Journal of Dermatological Science** **30**: 167 – 171.

SAMBROOK, J.J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2.ed. United States of America, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SPULS, P. L. WITKAMP, L. BOSSUYT, P. M. M. AND BOS, J. D. (1997) A  
systematic review of five systemic treatments for severe psoriasis. **British Journal of Dermatology** **137**: 943 – 949.

SZEGEDI, A. ALEKSZA, M. GONDA, A. IRINYI, B. SIPKA, S. HUNYADI, J. AND ANTAL-SZALMÁS, P. (2003) Elevated rate of T helper 1 (Th1) lymphocytes and serum IFN- $\gamma$  levels in psoriatic patients. **Immunology Letters** **86**: 277 – 280.

TAKAHASHI, H. KINOUCI, M. TAMURA, T. AND IIZUKA, H. (1995) Decreased  $\beta$ 2-sdrenergic receptor-mRNA and Loricrin-mRNA, and increased Involucrin-mRNA transcripts in psoriatic epidermics: analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction. **British Journal of Dermatology** **134**: 1065 – 1069.

TAKEYAMA, K.I., MASUHIRO, Y., FUSE, H., ENDOH, H., MURAYAMA, A., KITANAKA, S., SUZAWA, M., YANAGISAWA, J AND KATO, S. (1999)

Selective Interaction of Vitamin D Receptor with Transcriptional Coactivation by a Vitamin D Analog. **Molecular and Cellular Biology** **19(2)**: 1049-1055.

The Vitamin D Receptor (VDR) <http://geneticslabs.topcities.com/VDR.html>

TOMFOHRDE, J.; SILVERMAN, A.; BARNES, R.; FERANDEZ-VINA, M.A.; YOUNG, M.; LORY, D.; MORRIS, L.; WUEPPER, K.D.; STASTNY, P. & MENTER, A. (1994) Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. **Science** **20**; 264 (5162): 1141-1145.

TRAUPE. H. (1995) The puzzling genetics of psoriasis. **Clinics in Dermatology** **13**: 99 – 103

TREMBATH, R. C. CLOUGH, R. L. ROSBOTHAM, J. L. JONES A. B. CAMP, R. D. R. FRODSHAM, A. BROWNE, J. BARBER, R. TERWILLINGER, J. LATHROP, G. M. AND BARKER, J. N. W. N. (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by two stage genome-wide search in psoriasis. **Human Molecular genetics** **6(5)**: 813 – 820.

VAN DE KERKHOF, P. C. (1995) Biological activity of vitamin D analogues in the skin, with special reference to antipsoriatic mechanisms. **British Journal of Dermatology** **132**: 675 – 682.

ZMUDA, J. M. CAULEY, J. A AND FERRELL, R. E. (2000) Vitamin D receptor gene variants and osteoporosis. **Epidemiologic Reviews** **22(2)**: 203 – 217.

## Conclusões Gerais

- Não houve diferença para os polimorfismo Taq I, Fok I e Bsm I entre os grupos Controle e Portadores de Psoríase, nas condições utilizadas em nosso estudo.
- Não houve associação entre os polimorfismos Taq I, Fok I e Bsm I e os índices de Gravidade, sob nossas condições de estudo.
- Os resultados obtidos estão de acordo com dados da literatura internacional.
- Há necessidade de ampliar o número de pacientes estudados para precisão dos resultados.

## ANEXO I – Consentimento Informado

### Termo de Consentimento de Participação em Pesquisa

#### ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DE VITAMINA D EM BIÓPSIAS DE PELE DE PACIENTES COM PSORÍASE

Da pesquisa.

A Psoríase é Conhecida desde os tempos antigos. Tem seu nome derivado do grego psora, que significa coçar. É uma doença cutânea de caráter inflamatório e proliferativo, determinada geneticamente. As lesões mais características são placas crônicas avermelhadas, descamativas, fortemente demarcadas e presentes principalmente nas superfícies extensoras do corpo e couro cabeludo. Atinge cerca de 1,5 a 3% da população mundial. Apresenta-se com dois picos de incidência, um entre os 16 e 22 anos de idade e outro entre 57 e 60 anos. Embora não seja uma doença letal causa enorme transtorno aos seus portadores, uma vez que as alterações cutâneas são evidentes, causando desconforto e isolamento social do indivíduo.

Esta pesquisa se propõe a procurar o(s) gene(s) possivelmente envolvido(s) com a susceptibilidade a Psoríase. Para isso utilizará técnica de Display Diferencial de RNA mensageiro retirado de fragmentos de pele de pacientes com a doença.

Das Responsabilidades: Da equipe médica fica a responsabilidade de: (1) indicar tratamento próprio para o paciente, levando em conta todas as variáveis envolvidas na situação e dispondo do melhor tratamento com base no conhecimento médico / científico. (2) Executar os procedimentos cirúrgicos (biópsias) dentro de técnicas padronizadas de assepsia, analgesia e segurança, utilizando material próprio para o fim. (3) Realizar biópsias em região onde o impacto estético seja o menor possível. (4) Respeitar o sigilo ao nome, diagnóstico ou outros dados médicos pertinentes a que tenham conhecimento pelo exercício da pesquisa. (5) Repassar imediatamente qualquer descoberta que possa beneficiar ao(s) paciente(s), de forma a propiciar o melhor tratamento vigente. (6) Não realizar em qualquer instancia experiências in vivo.

Do(s) paciente(s): (1) Seguir atenta e rigorosamente às indicações médicas de tratamento e conduta. (2) Apresentar-se aos retornos e consultas de seguimento conforme a necessidade do caso.

Dos Critérios de Aceitação ou Recusa de Pacientes:

Serão aceitos para a pesquisa os pacientes que preencham os critérios clínicos de Psoríase Vulgar Psoríase Gutata, Psoríase Pustulosa ou Psoríase Eritrodérmica, e que esteja há pelo menos 4 semanas sem tratamento oral ou tópico. Pacientes que estiverem em uso de medicação e cuja suspensão possa acarretar exacerbação do quadro clínico serão recusados, assim como pacientes que forem julgados como incapazes de seguir às orientações médicas de tratamento.

Dos Critérios de Suspensão ou Encerramento da Pesquisa.

Como não se trará de pesquisa envolvendo experimentos in vivo, não existem parâmetros indicativos para suspensão. Aceita-se como único critério para suspensão da pesquisa o fato de haver reclamação por parte do paciente

---

Paciente

---

Dr Cristiano de Abreu A. Fernandes  
Médico CRM-33893  
CPF: 744.648.336-91  
Responsável pela Pesquisa

## ANEXO II – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) – Universidade Federal de Uberlândia – MG.



Universidade Federal de Uberlândia

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP -38400-089 ☎(034) 219 4131 - 235-2078

### PARECER COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 006/2000

PROJETO DE PESQUISA: "Análise da Expressão Gênica Diferencial em Psoríase."

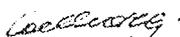
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cristiano de Abreu Amorim Fernandes

INSTITUIÇÃO: Coord. Pós-Graduação em Genética e Bioquímica - UFU

#### PARECER:

Serão utilizadas biópsias de pele de pacientes portadores de Psoríase vulgar, psoríase gutata e psoríase pustulosa. As biópsias serão retiradas em região que produza menor impacto estético aos pacientes e mediante o consentimento por escrito, em instrumento próprio. Assim sendo, somos de parecer favorável à sua execução.

Uberlândia 03 de março de 2000.

  
Prof. Humberto Eustáquio Coelho  
Coordenador do CEP - UFU

## ANEXO III – PASI

### PASI – Psoriasis Area and Severity Index

O PASI, índice de Área e Gravidade em Psoríase, consiste numa abordagem da percentagem de superfície acometida das áreas do corpo, cabeça (c), tronco (t), braços (b) e pernas (p) correspondendo há 10%, 20%, 30% e 40% da superfície corporal. O envolvimento dessas quatro áreas é dado por um valor numérico de 0 a 6 correspondendo há (0 – 100%). Em relação à lesão, quatro características são abordadas, eritema (E), espessura (S), descamação (D) e prurido (P), para os quais é dado um valor de 0 a 4 conforme tabela abaixo (MARKS *et al.* 1989, Dave's Psoriasis Information).

| superfície | Score |
|------------|-------|
| 0          | 0     |
| <10        | 1     |
| 10 – 29    | 2     |
| 30 – 49    | 3     |
| 50 – 69    | 4     |
| 70 - 89    | 5     |
| 90 - 100   | 6     |

| Severidade | Score |
|------------|-------|
| Nenhuma    | 0     |
| Alguma     | 1     |
| Moderada   | 2     |
| Severa     | 3     |
| Máxima     | 4     |

O PASI é calculado pela fórmula abaixo:

$$\text{PASI} = 0.1\text{Área}_c(E_c+S_c+D_c+P_c)+0.2\text{Área}_t(E_t+S_t+D_t+P_t)+0.3\text{Área}_b(E_b+S_b+D_b+P_b)+0.4\text{Área}_p(E_p+S_p+D_p+P_p)$$

## ANEXO IV – Restrições Enzimáticas

### Restrição pela Fok I

**Nome:** BseGI (*Fok I*)

**Fonte:** *Bacillus stearothermophilus*

**Sítio de Restrição:** 5'... G G A T G N N ↓...3'  
3'... C C T A C ↑ N N ...5'

**Condições de Restrição:** Tampão 0,8µl, Enzima 0,2µl H<sub>2</sub>O 2,0µl, DNA 5.0µl há 37° por 2:00horas.

### Restrição pela Bsm I

**Nome:** Mva1269I (*Bsm I*)

**Fonte:** *Micrococcus varians*

**Sítio de Restrição:** 5'... G A A T G C N ↓...3'  
3'... C T T A C ↑ G N ...5'

**Condições de Restrição:** Tampão 0,8µl, Enzima 0,5µl H<sub>2</sub>O 2,7µl, DNA 4.0µl há 37° por 16:00horas.

### Restrição pela Taq I

**Nome:** Taq I

**Fonte:** *Thermus aquaticus*

**Sítio de Restrição:** 5'... T ↓ C G A ...3'  
3'... A G C ↑ T ...5'

**Condições de Restrição:** Tampão 0,8µl, Enzima 0,2µl H<sub>2</sub>O 3,0µl, DNA 4.0µl há 37° por 2:00horas.

## ANEXO V – Protocolo de Extração de DNA de Tecidos

1. Macerar 20 mg de tecido em N<sub>2</sub> líquido.
2. Ressuspender em 800 µl de tampão TLN (400mM NaCl, 25mM EDTA, pH8,0 50mM Tris-HCl).
3. Transferir para microtubo de 2 ml, adicionar 50µl de SDS 10% e 20-40µl de 10mg/ml proteinase K. Incubar overnight ou, no mínimo, 2 horas à 65°.
4. Adicionar 300µl de 7M de NaCl saturado. Homogeneizar e deixar por 15 minutos no gelo.
5. Centrifugar a 15.000 rpm por 15min à 4°C e transferir 600µl do sobrenadante para um novo tubo.
6. Adicionar 800µl de etanol absoluto. Manter refrigerado por, no mínimo, 3 horas.
7. Precipitar o pellet a 15.000 rpm por 15 minutos, a 4°C.
8. Lavar o pellet em etanol 70%.
9. Retirar todo o etanol 70%. Secar o pellet por 5 minutos e ressuspender em 150µl a 250µl de tampão de diluição, dependendo do tamanho do pellet.
10. Diluir o pellet em "banho-maria" à 37°C por 45 minutos.

## **ANEXO VI – Protocolo de Extração de DNA de Sangue.**

1. Separa 500µl de sangue total da amostra e adicionar 300µl de TRIS-HCl 1M pH8,0.
2. Adicionar 150µl de solução D (Isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 10 a 25 mM e sarcosil 0,5%).
3. Agitar por 2 minutos no vortex.
4. Acrescentar 110µl de clorofórmio / álcool isoamílico 24:1.
5. Acrescentar 550µl de Fenol.
6. Centrifugar 10 minutos à temperatura ambiente ou à 4°C.
7. Coletar o sobrenadante.
8. Dobrar o volume com etanol 100%.
9. Deixar em overnight ou por duas horas em freezer -20°C.
10. Centrifugar por 15 minutos a temperatura de 4°C.
11. Dispensar o sobrenadante e secar o pellet em temperatura ambiente.
12. Ressuspender o DNA acrescentando 50µl de água ultra pura em cada amostra.

## ANEXO VII – Caracterização polimórfica dos pacientes

Tabela 9 - Tabela com a caracterização do polimorfismo do gene VDR nas 41 amostras.

| Indivíduo | Fok      | Taq | Bsm |     |
|-----------|----------|-----|-----|-----|
| 1         | Controle | FF  | TT  | Bb  |
| 2         | Controle | Ff  | Tt  | BB  |
| 3         | Controle | Ff  | TT  | Bb  |
| 4         | Controle | FF  | TT  | Bb  |
| 5         | Controle | Ff  | Tt  | bb  |
| 6         | Controle | FF  | TT  | Bb  |
| 7         | Controle | Ff  | Tt  | BB  |
| 8         | Controle | Ff  | Tt  | BB  |
| 9         | Controle | Ff  | TT  | BB  |
| 10        | Controle | FF  | Tt  | BB  |
| 11        | Controle | Ff  | Tt  | Bb  |
| 12        | Controle | FF  | Tt  | Bb  |
| 13        | Controle | FF  | Tt  | bb  |
| 14        | Controle | Ff  | TT  | Bb  |
| 15        | Controle | Ff  | Tt  | Bb  |
| 16        | Controle | FF  | TT  | bb  |
| 17        | Controle | ff  | tt  | BB  |
| 18        | Controle | Ff  | tt  | BB  |
| 19        | Controle | FF  | TT  | Bb  |
| 20        | Controle | ff  | tt  | bb  |
| 21        | Controle | ff  | TT  | Bb  |
| 22        | Controle | Ff  | Tt  | bb  |
| 23        | Controle | FF  | Tt  | bb  |
| 24        | Controle | FF  | TT  | bb  |
| 25        | Controle | FF  | Tt  | Bb  |
| 26        | Controle | Ff  | Tt  | bb  |
| 27        | Controle | Ff  | Tt  | Bb  |
| 28        | Controle | FF  | Tt  | Bb  |
| 29        | Controle | Ff  | TT  | BB  |
| 30        | Controle | FF  | Tt  | Bb  |
| 31        | Controle | Ff  | tt  | BB  |
| 32        | Controle | Ff  | TT  | --- |
| 33        | Controle | Ff  | tt  | --- |
| 34        | Paciente | FF  | Tt  | --- |
| 35        | Paciente | ff  | tt  | bb  |
| 36        | Paciente | Ff  | Tt  | --- |
| 37        | Paciente | Ff  | TT  | bb  |
| 38        | Paciente | Ff  | TT  | bb  |
| 39        | Paciente | FF  | tt  | BB  |
| 40        | Paciente | Ff  | TT  | --- |
| 41        | Paciente | FF  | TT  | --- |

Amostras de sangue controle

Amostras de pele controle

Amostras de pele acometidos