

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina – FM
Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Análise de polimorfismos no gene CTLA-4 em pacientes com
paracoccidioidomicose**

Viviane Furlan Lozano

Brasília-DF
Março/2008

Viviane Furlan Lozano

Análise de polimorfismos no gene CTLA-4 em pacientes com
paracoccidioidomicose

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Brasília – DF

Março/2008

Agradecimentos

A Deus por me dar saúde, sabedoria e persistência.

À minha família: meus pais, Valdomiro e Maria Alice; meus irmãos, Alessandro, Fábio e Vitor; minhas tias, Angelina e Luiza, pelo amor incondicional, que mesmo de longe nunca deixaram de me incentivar e acreditar em mim. Ao caçula, Vitor, meu companheiro nessa difícil jornada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe, pelos ensinamentos transmitidos e por acreditar na minha capacidade.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca, pelos ensinamentos, compreensão e amizade.

À Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva por toda a ajuda e incentivo durante o projeto.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Welerson Pereira pela dedicação e ensinamentos transmitidos.

Aos Profs. Drs. Alfredo Miranda de Góes, Maria Heloisa Souza Lima Blotta e Ana Joaquina Cohen, que gentilmente cederam amostras de pacientes para a realização do projeto.

Ao mestre e amigo, Prof. Dr. Sérgio Paulo Severo de Souza Diniz, pelo constante incentivo na carreira científica.

Ao querido Prof. Dr. Carlos Eduardo Tosta, pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

Aos professores Ildinete, Lídia, Andréa, Marcelo Fernando e Élide do Laboratório de Biologia Molecular e à professora Cynthia do Laboratório de Microbiologia pela atenção e incentivo dedicados.

À amiga Amabel, que possibilitou o início do meu mestrado.

Às amigas Yanna, Yllana, Cleide, Sônia, Adriana, Gianni, Vanuza, Rosana e Renata pela amizade sincera e compreensão em todos os momentos.

Às amigas, Sheila, Karla, Alciara e Dôres, sempre presentes, pessoas muito especiais.

Às queridas amigas de infância Alessandra e Juliana, pelo carinho.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular da UnB – Vera, Simoneide, Hugo, Larissa, Marcus, André, Alice, Marciano, Aldo e do laboratório de Patologia – Janayna e Cecília, por tudo que aprendi e pelo convívio maravilhoso.

Em especial aos colegas Hugo, Simoneide e Vera, que tanto me ajudaram.

Aos amigos do laboratório Exame – Ormy, Marlene, Welker, Carmita, José Fernando, Solange e Bruno pelo convívio diário e pelas boas risadas mesmo em meio a tanto trabalho.

Ao Prof. Dr. Raul Yukihiro Matsuschita e à Izabel, que prontamente me ajudaram com as análises estatísticas.

Aos novos colegas da UCB – Rodrigo, Dione e Túlio pela ajuda na fase final deste trabalho.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, que permitiram a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
1.1. Aspectos gerais da resposta imunológica	1
1.2. Estrutura do gene e expressão da proteína CTLA-4	6
1.3. O CTLA-4 e a susceptibilidade às doenças	8
1.3.1. A proteína CTLA-4	8
1.3.2. O polimorfismo no gene CTLA-4	10
1.4. A Paracoccidioidomicose (PCM)	15
1.4.1. O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e as características gerais da PCM	15
1.4.2. Formas clínicas da PCM	17
1.4.3. Resposta imunológica da PCM	18
1.5. Análise populacional e ancestralidade	20
2. Justificativa	23
3. Objetivos	24
3.1. Objetivos específicos	24
4. Materiais e Métodos	25
4.1. Amostras de sangue	25
4.1.1. Pacientes com PCM	25
4.1.2. Controles	25
4.2. Extração de DNA	25
4.2.1. Extração por fenol-clorofórmio	26
4.3. Quantificação dos DNAs	26
4.4. Genotipagem dos SNPs -318C/T e +49 ^a /G	27
4.5. Análise Populacional	28
4.5.1. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs)	28
4.5.2. Amplificação das seqüências alvo	32
4.5.3. Tratamento enzimático com EXOI/SAP	32
4.5.4. Reação de Miniseqüenciamento	32
4.5.5. Tratamento enzimático com SAP	33
4.5.6. Desnaturação	33
4.5.7. Eletroforese em seqüenciador automático	33
4.6. Análises estatísticas	33

5. Resultados	35
5.1. Análise do DNA genômico das amostras de pacientes e indivíduos controle	35
5.2. Análise do produto de PCR amplificado pelo oligo 1	35
5.3. Análise do seqüenciamento das amostras amplificadas pelo oligo 1	36
5.4. Análise do SNP -318C/T	38
5.5. Análise do SNP +49A/G	40
5.6. Associação haplotípica dos SNPs -318C/T e +49A/G	42
5.7. Análise da estrutura populacional	44
5.6.1. Reação de PCR e genotipagem	44
5.6.2. Caracterização da ancestralidade	45
6. Discussão	48
7. Conclusão	54
8. Perspectivas	54
9. Referências	55

RESUMO

A proteína CTLA-4 é expressa principalmente em células T ativadas, possuindo um papel fundamental na resposta imune, exercendo efeito regulador na ativação de célula T através da sua ligação com as moléculas da família B7, as quais são expressas em células apresentadoras de antígenos. Polimorfismos do gene CTLA-4 têm sido associados a várias doenças autoimunes e, recentemente, à doenças neoplásicas e infecciosas. A paracoccidiodomicose é uma micose sistêmica, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. As manifestações clínicas desta doença estão associadas a vários fatores como a secreção alterada de citocinas, hipergamaglobulinemia, e depressão da imunidade celular, sendo que a hiporesponsividade é também atribuída a uma maior expressão de CTLA-4 em células T de pacientes quando comparados a indivíduos controles. O presente trabalho teve por objetivo estudar a possível associação dos SNPs -318C/T na região promotora e +49A/G do éxon 1 do gene CTLA-4 com a PCM. Para isso, 74 pacientes com PCM e 76 indivíduos controles provenientes de regiões distintas do País tiveram suas frequências alélicas e genotípicas determinadas. A comparação das frequências genotípicas e alélicas, entre os grupos pacientes e controles, não mostrou diferenças significativas que pudessem associar o polimorfismo dos SNPs -318 e +49 do gene CTLA-4 com a PCM. A análise dos resultados referentes às frequências haplotípicas obtidas mostrou que existe um forte desequilíbrio de ligação ($D' = 1$) entre os SNPs -318 e +49 para os dois grupos estudados. Porém, a análise realizada não revelou diferenças significativas entre as frequências haplotípicas dos grupos. Outro ponto importante analisado foi o estudo da estrutura genética (ancestralidade) dos grupos de pacientes e controles. Verificou-se que há predomínio de ancestralidade européia sobre as ancestralidades ameríndia e africana em ambos os grupos. Através desses resultados foi possível determinar que a população utilizada no estudo é geneticamente homogênea, e que o resultado negativo da associação detectado para o gene CTLA-4 e a PCM não está relacionado a ancestralidade da amostragem. Este trabalho demonstra que não foi observada nenhuma associação entre o polimorfismo dos SNPs -318 e +49 do gene CTLA-4 com a resistência e/ou susceptibilidade à Paracoccidiodomicose.

ABSTRACT

The CTLA-4 protein is mainly expressed in activated T cells and plays an essential role in the immune response through its regulatory effect on T cell activation. This activity is mediated by the binding of CTLA-4 to molecules of the B7 family that are expressed by antigen-presenting cells. Polymorphisms of the CTLA-4 gene have been correlated to several autoimmune pathologies and, more recently, to neoplastic and infectious illnesses. Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic pathogen *Paracoccidoides brasiliensis*. Its symptoms are associated to various factors, including altered secretion of cytokines, hypergammaglobulinaemia and suppression of cellular immunity. This low responsiveness is also attributed to a higher expression of CTLA-4 in the cells of patients relative to control individuals. This work aimed at studying possible associations of PCM and two single nucleotide polymorphisms (SNPs) of CTLA-4, namely -318C/T in the promoter and +49A/G in exon 1. To this end, 74 PCM patients and 76 controls from different regions of the country had their allelic and genotypic frequencies determined. The comparison of genotypic and allelic frequencies had not showed significant differences between patient and control groups which could associate the CTLA-4 gene SNPs to PCM. The analysis of results concerning haplotypic frequencies revealed a strong linkage disequilibrium ($D'=1$) between SNPs -318 and +49 for the two groups. Nevertheless, the analysis did not reveal significant differences of haplotypic frequencies between groups. Another important focus of study was the genetic structure (ancestry) of the patient and control groups. There was a predominance of European over Amerindian and African ancestries in both groups. From the results it was possible to determine that the population used in this study was genetically homogeneous, and that the absence of an association between polymorphisms of CTLA-4 and PCM cannot be attributed to ancestral bias. This work shows that there is no association of SNPs -318 and +49 of CTLA-4 and resistance and/or susceptibility to paracoccidioidomycosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da resposta imunológica

A imunidade é definida, de forma abrangente, como uma reação a microrganismos e macromoléculas como proteínas e polissacarídeos, independentemente das conseqüências fisiológicas ou patológicas de tal reação. Porém, o seu equilíbrio é fundamental para garantir a adequada proteção ao hospedeiro, controlando a resposta inflamatória e os prejuízos imunopatológicos que possam ser provocados (Abbas & Lichtman, 2005; Butty *et al.*, 2007).

A resposta imune é representada pela imunidade inata ou natural e pela imunidade adaptativa ou adquirida. A imunidade inata fornece a linha de defesa inicial contra os microrganismos. Os principais componentes da imunidade inata são: barreiras físicas e químicas; células NK (*natural killers*); proteínas do sistema complemento e outras proteínas plasmáticas; citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina IL-1; células fagocitárias: células dendríticas (DC), neutrófilos e monócitos/macrófagos (Medzhitov & Janeway, 1997; Romani, 2004). O processo de reconhecimento dos antígenos depende dos receptores de reconhecimento padrão (PRR), presentes em grande diversidade na membrana plasmática de DCs e outros fagócitos, podendo estar presentes no soro, fluídos de tecidos ou citoplasma celular. Os PRRs reconhecem moléculas estruturais invariantes comuns a um grande número de patógenos conhecidas como padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) (Janeway & Medzhitov, 2002). Os receptores *Toll-like* (TLR) são os principais PRRs presentes em macrófagos e neutrófilos e representam uma classe de proteínas transmembrana que reconhecem determinados PAMPs, ativando vias de sinalização celulares, resultando na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (Pasare & Medzhitov, 2004; Levitz, 2004). Os componentes da resposta imune inata freqüentemente reagem de modos distintos a diferentes microrganismos como os intracelulares e extracelulares e, desse modo, influenciam o tipo de resposta imune adaptativa que se desenvolve (Abbas & Lichtman, 2005).

A imunidade adaptativa possui especificidade para distinguir um grande número de substâncias microbianas ou não, e habilidade de memória em responder com mais intensidade a exposições subseqüentes ao mesmo microrganismo. A imunidade adaptativa pode ser dividida em imunidade humoral e celular. A imunidade humoral é mediada principalmente pelos linfócitos B e os anticorpos por eles produzidos, enquanto que a imunidade celular é mediada principalmente pelos linfócitos T e seus produtos como as citocinas (Abbas & Lichtman, 2005). As células T CD4⁺ podem se diferenciar em subpopulações de células

efetoras que produzem diferentes citocinas, desempenhando funções distintas. As subpopulações mais bem definidas são as células Th1 e Th2 (**Figura 1**) e seu conhecimento tem sido bastante útil no entendimento dos mecanismos de defesa imunológica em infecções e também no planejamento de estratégias terapêuticas (Jankovic *et al.*, 2001; Kidd, 2003).

As reações imunes crônicas são normalmente representadas por uma das populações Th1 ou Th2, e a proporção da subpopulação presente pode determinar a função protetora ou a consequência patológica da resposta (Abbas & Lichtman, 2005). Os linfócitos Th1 e Th2 diferenciam-se a partir de uma célula T precursora denominada Th0 sob influência principalmente, mas não unicamente, das citocinas produzidas pelas células do sistema imune logo após a infecção (IL-12 para Th1 e IL-4 para Th2). Por exemplo, em uma resposta típica à infecção fúngica, ocorre uma produção de IL-12 pelas DCs e macrófagos seguida pela produção de IFN- γ por linfócitos NK em resposta à IL-12. Isso induz uma resposta mediada por Th1, que caracteriza a imunidade celular. Por outro lado, a produção inicial de IL-4 pelas DCs ou por leucócitos como linfócitos B, eosinófilos, basófilos ou mastócitos direciona uma resposta do tipo Th2, a qual caracteriza a imunidade humoral (Kidd, 2003; Romani, 2004). Os linfócitos Th1 produzem IFN- γ , TNF β e IL-12 enquanto que os linfócitos Th2 produzem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 entre outros (Jankovic *et al.*, 2001; Kidd, 2003). A IL-10 é freqüentemente classificada como uma citocina tipo Th2 em camundongo, porém no homem tanto os linfócitos Th1 como Th2 secretam IL-10 (Katsikis *et al.*, 1995).

Outra subpopulação de célula T auxiliar é a célula Th3, um linfócito T CD4⁺CD25⁺ imunoregulador (Treg), que secreta o TGF- β (fator transformador de crescimento beta) e IL-10 (Letterio & Roberts, 1998). Há fortes evidências de que as Treg sejam especializadas na atenuação das respostas imunológicas, tendo como função principal a regulação ou supressão das respostas mediadas por linfócitos Th1 e Th2 (Cavassani *et al.*, 2006). Além das subpopulações efetoras da linhagem de células auxiliares T CD4⁺ existem ainda as células efetoras T CD8⁺, e elas respondem a microrganismos que podem infectar qualquer célula nucleada. A diferenciação das células T CD8⁺ virgens em linfócitos T citolíticos (CTLs) funcionais requer a participação das células T CD4⁺. Os CTLs reconhecem e eliminam células-alvo que expressam peptídeos antigênicos estranhos em associação a moléculas MHC classe I. São capazes de secretar citocinas, principalmente IFN- γ , linfotoxinas e TNF, os quais atuam na ativação dos fagócitos e induzem a inflamação (Abbas & Lichtman, 2005).

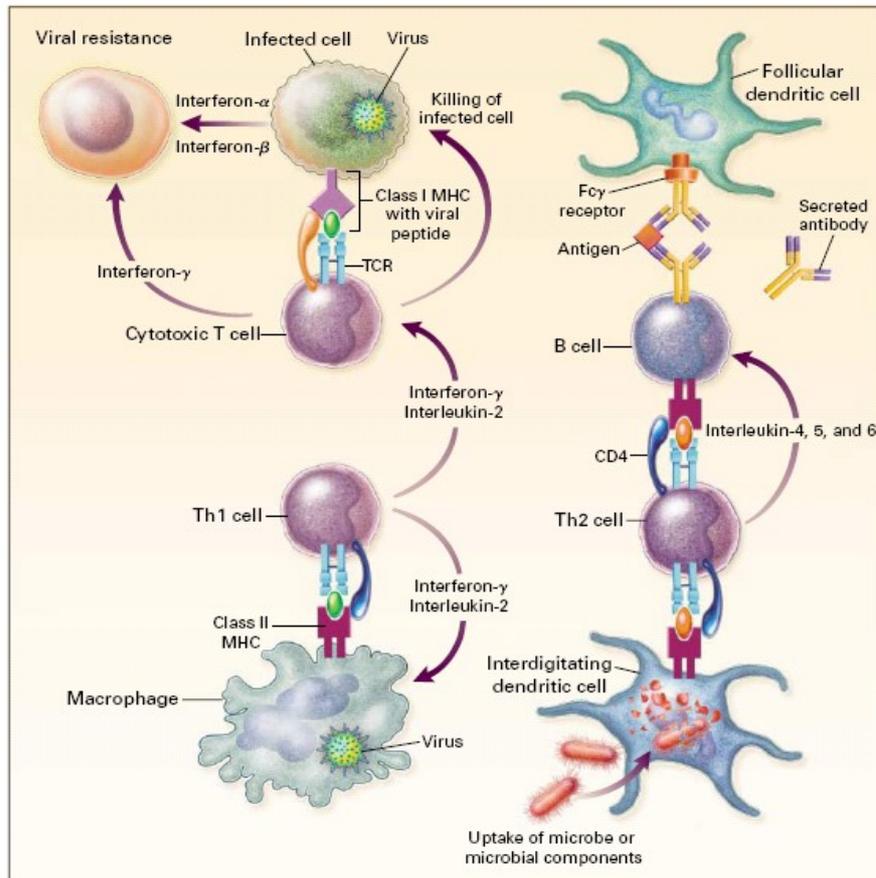


Figura 1. Visão geral da resposta linfocitária. Os linfócitos T possuem o receptor de célula T (TCR), que reconhece o antígeno apresentado pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) presente nas células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos T citotóxicos (CD8+) reconhecem os antígenos apresentados pelas moléculas do MHC-I, eliminando as células infectadas por microrganismos intracelulares como os vírus, prevenindo sua replicação. Ainda, estes linfócitos, quando ativados, secretam interferon- γ (IFN- γ), que juntamente com os interferons α e β produzidos pelas células infectadas, promovem um estado de resistência à infecção viral. Os linfócitos T auxiliares (CD4+) reconhecem os antígenos apresentados pelas moléculas do MHC-II e podem ser divididos em duas sup-populações principais: os linfócitos Th1, que secretam IFN- γ e IL-2 os quais ativam macrófagos e linfócitos T citotóxicos para eliminarem os microrganismos; e os linfócitos Th2, que secretam IL-4, IL-5 e IL-6 as quais auxiliam na estimulação dos linfócitos B para que estes produzam anticorpos protetores. Os linfócitos B reconhecem o antígeno de forma direta, ou na forma de imunocomplexos nas células dendríticas nos centros germinativos (Delves & Roitt, 2000).

De maneira geral, os linfócitos T e B precisam de um duplo sinal para iniciar sua proliferação e diferenciação em células efetoras, como também para regular a resposta imune desencadeada por algum processo de ativação. No caso das células T o primeiro sinal, que garante a especificidade da resposta imunológica subsequente, é representado pela ligação do complexo formado pelo peptídeo-MHC ao receptor de célula T (TCR) e aos co-receptores CD4 e CD8. O segundo sinal é gerado pela interação de moléculas co-sinalizadoras das células apresentadoras de antígenos (APCs) - as proteínas da família B7 - com moléculas co-sinalizadoras específicas das células T (Chen, 2004; Abbas & Lichtman, 2005). As proteínas B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86 respectivamente) são os co-sinalizadores mais bem definidos para as células T e são induzidos nas APCs por moléculas de microrganismos e por citocinas produzidas durante a resposta imune inata (Parjis & Abbas, 1998). A maioria das moléculas co-sinalizadoras presentes nas células T são componentes importantes das sinapses imunológicas (representadas pela superfície celular formada entre a célula T e a APC). Tais moléculas podem ser classificadas em co-estimulatórias, que amplificam a resposta mediada pelo TCR e garantem a ocorrência de uma resposta imune celular e em co-inibitórias, que diminuem este tipo de resposta promovendo a manutenção da homeostase imunológica. A falta de um sinal co-estimulatório leva a uma diminuição da resposta imune e, em alguns casos, induz à anergia (falta de resposta à estimulação antigênica) e até mesmo à morte celular (Parjis & Abbas, 1998; Chen, 2004; Moretta & Bottino, 2004). As moléculas CD28 e CTLA-4 (antígeno 4 de linfócito T citotóxico) são co-sinalizadores presentes nas células T e possuem funções complementares na resposta imune (**Figura 2**). A interação CD28/B7 promove um sinal positivo relacionado à ativação de células T e amplifica a resposta imune celular; em contraste, a interação CTLA-4/B7 exerce papel regulador, diminuindo a resposta gerada (Ling *et al.*, 2001; Butty *et al.*, 2007). Outras moléculas têm sido descritas com funções sinalizadoras na resposta imune como o co-estimulador induzível ICOS, o programa de morte celular PD-1 e o atenuador de linfócitos B e T – BTLA. Porém, ambos ligam-se a outros membros da família B7 que não B7-1 e B7-2 (Greenwald *et al.*, 2005).

A imunidade adaptativa tem a função de defesa do hospedeiro contra infecções microbianas, mas as respostas imunes também podem provocar lesão tecidual e doença. Os distúrbios causados por respostas imunes são chamados de doenças causadas por hipersensibilidade. Uma causa comum dessas doenças é a falha da auto-tolerância, a qual assegura que os indivíduos normalmente não respondam a seus antígenos próprios. As doenças causadas por falha na auto-tolerância são chamadas de doenças auto-imunes. As doenças causadas por hipersensibilidade também podem resultar de respostas descontroladas

ou excessivas contra antígenos estranhos, como microrganismos e antígenos ambientais não-infecciosos (Abbas & Lichtman, 2005).

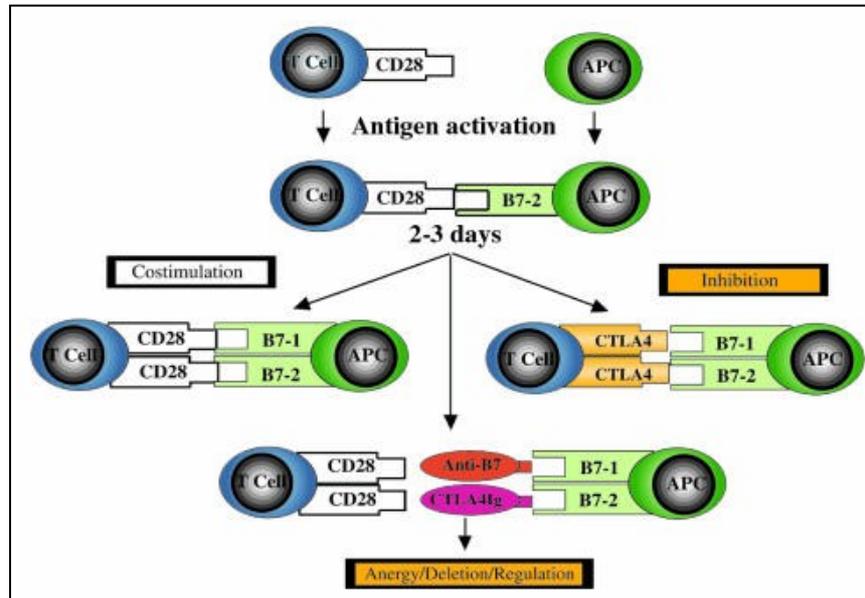


Figura 2. Complexidade da via co-estimulatória de célula T: CD28/CD152-B7-1/B7-2. Após a interação peptídeo-MHC/TCR (dados não mostrados), o CD28 interage com B7-2 e posteriormente com B7-1, expressos nas células apresentadoras de antígenos (APC). Isto resulta na transdução de um sinal co-estimulatório positivo para a célula T, culminando com a produção de citocinas, expansão clonal, e prevenção da anergia e morte celular. As células T ativadas expressam então o CTLA-4, homólogo ao CD28, porém sua interação com B7-1 e B7-2 promove um sinal negativo para a célula T, resultando em inibição da produção de citocinas e da progressão do ciclo celular, finalizando a resposta imune. O uso de agentes biológicos como anticorpos monoclonais anti-B7 ou CTLA-4Ig resulta em anergia da célula T *in vitro*, e em anergia, deleção, ou indução de células T regulatórias *in vivo* (Sayegh, 2004).

Estudos recentes mostram que os genes CTLA-4 e CD28 e alguns de seus polimorfismos conferem susceptibilidade às doenças auto-imunes e infecciosas por meio da regulação da ativação de células T. O CTLA-4, expresso principalmente em células T ativadas, tem papel fundamental na regulação da resposta imune, ligando-se às moléculas B7 presentes nas APCs, funcionando como um regulador negativo da ativação de célula T. Dessa forma, o papel inibitório do CTLA-4, na manutenção da homeostase das reações imunes e inflamatórias, tornou-o um gene candidato potencial na determinação de predisposições genéticas para doenças auto-imunes e infecciosas (Cheng *et al.*, 2006).

1.2. Estrutura do gene e expressão da proteína CTLA-4

O gene CTLA-4 humano foi mapeado no cromossomo 2q33 em humanos por Dariavach *et al.* (1988). Este gene possui 7195 kilobases (kb) (Ling *et al.*, 1999), e apresenta 4 éxons (**Figura 3**), os quais codificam respectivamente o peptídeo de sinalização, o domínio de ligação ou extracelular, o domínio transmembrana e a região citoplasmática do gene (Harper *et al.*, 1991; Ling *et al.*, 1999). Está intimamente ligado ao gene CD28 (Harper *et al.*, 1991) e dentro do domínio extracelular o motivo de ligação às moléculas B7, centralizado nos aminoácidos MYPPY, corresponde a uma seqüência também encontrada no domínio extracelular do CD28 (Balzano *et al.*, 1992). O domínio citoplasmático codifica o motivo YVKM, no qual o estado de fosforilação da tirosina (Y) está relacionado à internalização do CTLA-4 da membrana plasmática, com subsequente acúmulo intracelular via endocitose mediada pela clatrina (Ling *et al.*, 1999).

Embora o CTLA-4 e o CD28 tenham funções opostas, esses dois receptores mostram similaridade entre os seus genes (ambos localizados no cromossoma 2q33) e suas proteínas em humanos e camundongos, sugerindo fortemente que ambos os genes são resultado de uma duplicação gênica que deve ter ocorrido antes da divergência entre as espécies sendo, entretanto, suficientemente recente para revelar a sua homologia (Harper *et al.*, 1991; Balzano *et al.*, 1992; Ling *et al.*, 1999; Kristiansen *et al.*, 2000; Gough *et al.*, 2005).

Dois transcritos do gene CTLA-4 são codificados, com 1,8 e 0,8 Kb respectivamente, gerando duas isoformas conhecidas: flCTLA-4 (isoforma de comprimento total) expressa na superfície de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas e sCTLA-4 (isoforma solúvel), sendo que esta última representa uma forma de *splicing* alternativo do mRNA e não possui o éxon 3, que codifica o domínio transmembrana. O sCTLA-4 é traduzido, secretado, e está presente no soro humano, podendo ligar-se às moléculas B7 e inibir a proliferação celular *in vitro* (Harper *et al.*, 1991; Ueda *et al.*, 2003; Gough *et al.*, 2005).

A proteína CTLA-4 é expressa em maior quantidade nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ recentemente ativadas, por meio de indução transcricional ou redistribuição celular (Gough *et al.*, 2005; Butty *et al.*, 2007). A proteína CD28, nos seres humanos, é expressa de forma constitutiva em mais de 90% das células T CD4⁺ e em 50% das células T CD8⁺. A afinidade do CTLA-4, comparada ao CD28 para seus ligantes comuns B7-1 e B7-2, é muito maior e seus níveis de expressão na superfície celular alcançam 1/30-50 dos níveis de CD28 (Jago *et al.*, 2004; Gough *et al.*, 2005). A molécula B7-1 possui dois sítios de ligação para CD28/CTLA-4, ao contrário de B7-2 que tem estrutura monomérica. Dado que o CD28

possui apenas um sítio de ligação e menor avididade, a interação B7-1-CTLA-4 é então favorecida, considerando-se também que B7-1 recruta e estabiliza a molécula de CTLA-4 na sinapse imunológica, o que não ocorre na interação com o CD28 (Mao *et al.*, 2004; Gough *et al.*, 2005).

O CTLA-4, em células não-ativadas, localiza-se intracelularmente em vesículas semelhantes a lisossomos secretores. Enquanto uma quantidade significativa da proteína CTLA-4 é transportada para a superfície celular após a estimulação pelo TCR, ela também é rapidamente endocitada através do complexo adaptador da clatrina (AP-2) e, portanto, apenas uma pequena porção continua presente na superfície celular sob condições controladas (Shiratori *et al.*, 1997; Gough *et al.*, 2005). O domínio citoplasmático defosforilado do CTLA-4 interage com AP-2, resultando na rápida endocitose do CTLA-4 da superfície celular; porém, quando este domínio está fosforilado, o CTLA-4 é estabilizado na superfície (Egen *et al.*, 2002).

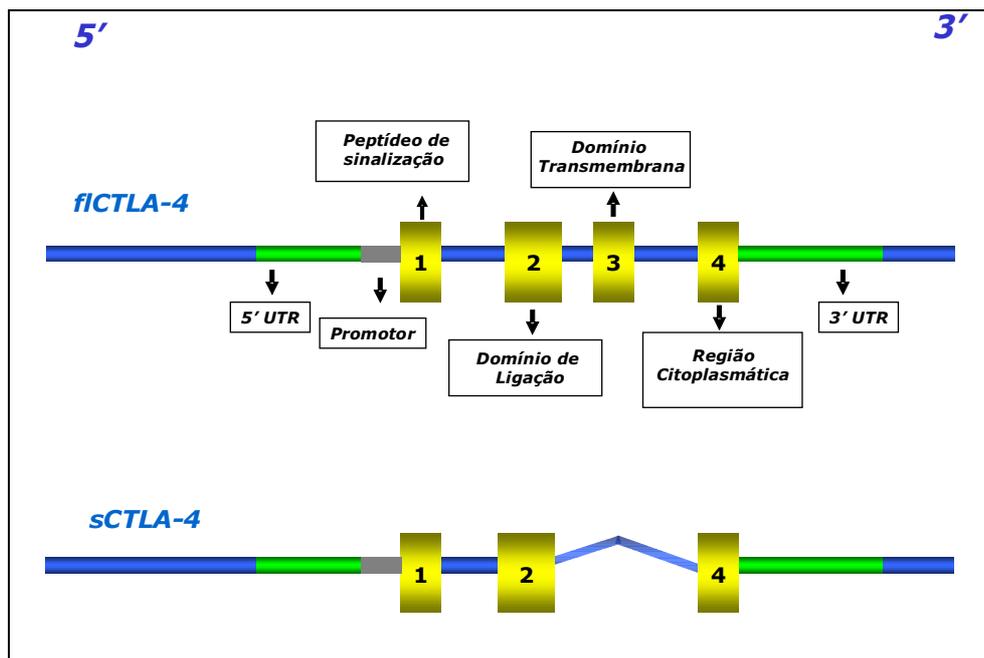


Figura 3. Representação esquemática das isoformas codificadas pelo CTLA-4. Em fICTLA-4 (isoforma de comprimento total) estão representados os éxons 1, 2, 3 e 4. Em sCTLA-4 (isoforma solúvel) verifica-se a ausência do éxon 3 (adaptado de van Oosterhout *et al.*, 2004).

Segundo Gough *et al.* (2005) o padrão do controle de expressão de CTLA-4 pode ser explicado pelo fato de que a restrição do mesmo na superfície celular permite uma melhor interação entre o CD28 e seus ligantes, favorecendo a ativação de célula T, enquanto que a rápida alteração na expressão de CTLA-4 na sinapse imunológica, após a ativação da célula

T, permite um sistema inibitório finamente regulado. Como a função do CTLA-4 está intimamente relacionada à sua expressão, Jago *et al.* (2004) determinaram a cinética de regulação do CTLA-4 em vários subtipos de células T, incluindo as células T não-ativadas, células T de memória, as células Treg CD4+CD25+ e as não-regulatórias. Eles observaram que, assim como o CTLA-4 de superfície celular pode ser recrutado de estoques intracelulares, a presença de reservatórios pré-existentes poderia ter um papel importante determinando a capacidade para expressão na superfície. Seus resultados mostraram que as células T não-ativadas possuem um reservatório intracelular pequeno enquanto que as células T de memória possuem um reservatório maior de CTLA-4. Foram verificados também níveis intracelulares significantes de CTLA-4 em células CD4+CD25+, confirmando sua ação em células Treg. Eles verificaram ainda que, após serem estimuladas, as células Treg e as células T de memória mantinham a expressão de CTLA-4 na superfície celular por mais tempo que as células T não-ativadas e as células não-regulatórias. Isso sugere que a manutenção da expressão de CTLA-4 na superfície celular pode ser mais importante que os níveis de expressão das células não-ativadas, e que os níveis intracelulares de CTLA-4 podem estar relacionados ao histórico de estímulos pelo qual a célula foi submetida (Jago *et al.*, 2004).

1.3. O CTLA-4 e a susceptibilidade às doenças

1.3.1. A proteína CTLA-4

Doenças auto-imunes como diabetes tipo I (T1D), o hipotireoidismo auto-imune (AIH), a doença de Graves (GD) e a artrite reumatóide (RA) acontecem por uma falha em um ou mais mecanismos do sistema imunológico, que estabelecem e mantêm a não-responsividade ou tolerância ao próprio organismo. Como as doenças citadas estão regularmente agrupadas nas mesmas famílias, é provável que elas compartilhem a mesma base genética. De fato, o risco a essas doenças tem sido associado com a mesma região no cromossoma 2q33, a qual contém os genes reguladores dos linfócitos T (CD28, CTLA-4 e ICOS), que são os únicos genes funcionais dessa região (Ueda *et al.*, 2003). A importância do CTLA-4 nos mecanismos de homeostase do sistema imunológico é evidenciada através da observação de que camundongos nocauteados para o gene CTLA-4 desenvolvem espontaneamente desordens linfoproliferativas acompanhadas pela infiltração letal de muitos órgãos por células T policlonais (Tivol *et al.*, 1995; Chen, 2004; Abbas, 2005). Adicionalmente, as respostas auto-imunes nesses camundongos sofrem influência do CD28, pois a sua ausência elimina a doença linfoproliferativa anteriormente instalada. Isso confirma

que a co-estimulação por CD28 é suprimida pela sinalização de CTLA-4 (Chen, 2004; Moretta & Bottino, 2004). Uma variante do CTLA-4 denominada liCTLA-4 não possui o éxon 2, que codifica o domínio de ligação, sendo portanto incapaz de se ligar às moléculas B7-1 e B7-2. A proteína liCTLA-4 é capaz de inibir a função de células T atuando sobre o TCR. Esta forma alternativa do CTLA-4 tem uma ligação genética com diabetes tipo I em camundongos diabéticos não-obesos (NOD), e sua expressão está aumentada em células Treg e células de memória dos camundongos resistentes a essa doença, sugerindo que o aumento da sinalização negativa fornecida pelo liCTLA-4 pode regular o desenvolvimento de doenças auto-imunes mediadas por células T (Vijayakrishnan *et al.*, 2004; Moretta & Bottino, 2004).

Além da correlação do CTLA-4 com doenças auto-imunes, alguns grupos estudaram o papel dessa molécula em doenças infecciosas. Martins *et al.* (2004) estudaram os efeitos decorrentes do bloqueio do CTLA-4 na parasitemia de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* e verificaram que isso aumentava a produção de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico (NO), que são fatores importantes envolvidos na resistência à infecção pelo *T. cruzi*, resultando em uma diminuição da parasitemia. Da mesma forma, verificou-se que o bloqueio da molécula de CTLA-4 aumenta a resistência à infecção pela *Leishmania donovani* (Murphy *et al.*, 1998) e pelo *Nippostrongylus brasiliensis* (McCoy *et al.*, 1997). No caso da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) a expressão diferenciada de CTLA-4 pode provocar diferentes efeitos em circunstâncias especiais. É sabido que células T CD4+ ativadas estão relacionadas à multiplicação aumentada do HIV. A maior expressão de CTLA-4 nessas células poderia refletir no controle da replicação viral durante a fase aguda da infecção, diminuindo a ativação celular e conseqüentemente a replicação viral. Já durante a fase crônica, o efeito da expressão aumentada de CTLA-4 poderia estar relacionado com uma maior depleção de células T CD4+ e CD8+ através de anergia e apoptose, diminuindo ainda mais a resposta imune contra o vírus, acelerando o curso da doença (Shao *et al.*, 2006). Cavassani *et al.* (2006) demonstraram que células Treg com expressão aumentada de CTLA-4 estavam presentes nas lesões e no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM), sugerindo uma potencial função dessas células em regular a ação efetora das APCs e das células T. Campanelli *et al.* (2003) investigaram a participação de moléculas co-sinalizadoras na hiporesponsividade celular verificada em pacientes com PCM, avaliando a cinética de expressão de CD28 e CTLA-4 nesses pacientes comparados a indivíduos controle. Eles verificaram que a expressão de CD28 era muito similar em células do sangue periférico de pacientes e controles. Em contraste, a expressão de CTLA-4 em células de pacientes com PCM era significativamente maior que dos indivíduos controle, indicando que a expressão do

CTLA-4 poderia estar envolvida na hiporesponsividade encontrada nas células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com PCM.

Atualmente estão sendo estudadas aplicações terapêuticas para as moléculas co-inibitórias. O bloqueio destas moléculas por antagonistas, como anticorpos monoclonais, poderia levar ao aumento da resposta de células T, podendo ser aplicado na promoção da imunidade celular contra antígenos tumorais ou infecções virais. Ao contrário, o uso de agonistas dessas moléculas poderia suprimir a resposta imune mediada por células T e ser aplicado no tratamento de doenças auto-imunes, rejeições de transplantes e respostas inflamatórias. Em alguns modelos clínicos, a proteína de fusão CTLA-4-Ig tem sido testada em uma variedade de doenças incluindo psoríase severa e artrite reumatóide, promovendo benefícios clínicos como a diminuição da resposta imune celular sem efeitos colaterais graves, podendo induzir uma diminuição transitória ou permanente da resposta imune em portadores dessas doenças (Chen, 2004).

1.3.2. O polimorfismo no gene CTLA-4

Os polimorfismos correspondem a alterações na seqüência de nucleotídeos em membros individuais da população. O tipo mais simples de polimorfismo é o SNP, onde há uma mutação de base única, que substitui um nucleotídeo por outro. Os SNPs não necessariamente possuem alguma relevância no desenvolvimento de doenças; eles podem ser variantes anônimas dentro de/ou entre genes, ou podem ser funcionais, mutações causais. Existem mais SNPs no genoma humano do que qualquer outro tipo de polimorfismo. Aproximadamente três milhões de variantes foram relatadas e catalogadas em um banco de dados público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) (Cardon & Palmer, 2003).

Polimorfismos envolvendo a região promotora do CTLA-4 (-318 C/T), o éxon 1 (+49 A/G), e a região 3'UTR [microsatélite (AT)_n] têm sido estudados por apresentarem ligação com várias doenças auto-imunes e, recentemente, com algumas doenças neoplásicas e infecciosas. O primeiro SNP, -318 C/T, mostra a substituição de uma citosina por uma timina (Deichmann *et al.*, 1996) e poderia influenciar os níveis de expressão gênica do CTLA-4 devido à sua localização na região promotora (Holopainem *et al.*, 2004); o segundo, +49 A/G, mostra a substituição de uma adenina por uma guanina, que leva à troca do aminoácido treonina por alanina do códon 17 do peptídeo sinal (Nistico *et al.*, 1996); e, finalmente, o polimorfismo microsatélite (AT)_n, com pelo menos 23 alelos diferentes contendo repetições que variam de 7 a 30 AT (Polymeropoulos *et al.*, 1991). Alguns autores identificam este polimorfismo de diferentes formas, que podem ser baseadas nos tamanhos dos produtos de

PCR em pares de base (bp) ou de acordo com o número de repetições. A repetição (AT)_n pode afetar a estabilidade do mRNA do CTLA-4 e, conseqüentemente, o nível de expressão deste gene (Huang *et al.*, 2000).

Trabalhos recentes mostram a relação entre o polimorfismo na posição +49 do éxon 1 e a regulação negativa exercida sobre a ativação da célula T. Este polimorfismo afeta a função inibitória do CTLA-4, sendo que o alelo +49G está associado a uma resposta proliferativa celular T aumentada (Kouki *et al.*, 2000). Segundo estes autores, algumas hipóteses poderiam explicar a ocorrência causada pelo polimorfismo, que afeta a seqüência líder através: **a)** do nível de expressão da proteína; **b)** transporte intracelular de CTLA-4 e, **c)** ativação diminuída da via de sinalização negativa ou ainda diminuição da apoptose. Posteriormente, Mäurer *et al.* (2002) avaliaram a alteração funcional envolvendo o polimorfismo +49A/G com a ativação da célula T e localização intracelular. Eles demonstraram padrões qualitativamente diferentes de distribuição intracelular do CTLA-4 entre indivíduos com os genótipos G/G e A/A na posição +49, além de notarem uma resposta proliferativa aumentada em células T dos indivíduos com o genótipo G/G. Gough *et al.* (2005) verificaram que maiores quantidades de mRNA de sCTLA-4 eram produzidas por indivíduos portadores dos genótipos A/A (considerado então protetor para doenças auto-imunes) ao contrário dos portadores de G/G, enquanto que nenhuma diferença foi observada para a isoforma fICTLA-4. Ainda, verificaram que a razão entre o mRNA de sCTLA-4 e fICTLA-4 era 50% menor em células T CD4⁺ não estimuladas de indivíduos portadores do genótipo GG comparada aos portadores de AA. Esses resultados demonstram que os alelos susceptíveis associados a esta região podem determinar a eficiência da produção de sCTLA-4, com o haplótipo susceptível à doença produzindo menor quantidade do transcrito de sCTLA-4 do que o haplótipo protetor.

De acordo com Anjos *et al.* (2002) a associação com diabetes tipo 1 tem se limitado a um haplótipo abrangendo o CTLA-4 mas não os genes adjacentes. O haplótipo é composto dos três polimorfismos já citados, que estão em desequilíbrio de ligação (LD) entre si e, por causa disto, alguns estudos funcionais seriam necessários para definir as variantes etiológicas. Entenda-se por LD a situação na qual uma determinada combinação de alelos, chamada de haplótipo, encontra-se numa freqüência estatisticamente diferente daquela esperada caso os alelos estivessem associados aleatoriamente (Lewontin, 1988). Dessa forma, Anjos *et al.* (2002) apresentaram um modelo onde o polimorfismo da região +49G/G provoca a alteração do tráfego intracelular de CTLA-4 por meio de diferenças no processo de glicosilação da proteína. Este processo compromete sua expressão na superfície celular em cerca de um terço

a menos do que a quantidade de proteína expressa pelos homozigotos +49A/A, favorecendo a ativação celular aumentada e levando a uma maior predisposição às doenças auto-imunes.

O primeiro caso relatado sobre a associação entre polimorfismo no gene CTLA-4 e doença auto-imune foi na doença de Graves, descrito por Yanagawa *et al.* (1995), envolvendo o microsatélite (AT)_n na região 3'UTR. Eles verificaram a presença de 21 alelos diferentes, variando entre 88 e 134 bp, na população caucasiana estudada. Nas análises de associação, as frequências de genótipos entre pacientes e controles diferiram significativamente e tal diferença foi atribuída à alta frequência do alelo de 106 bp entre os pacientes com doença de Graves. No ano seguinte, Nistico *et al.* (1996) relataram a associação entre o SNP +49 A/G com o diabetes tipo 1 e a doença de Graves, onde o alelo +49G mostrou estar em desequilíbrio de ligação com o alelo microsatélite de 106 bp. Vários outros estudos foram realizados envolvendo o SNP +49 A/G e sua associação com diabetes tipo 1 (Anjos & Polychronakos, 2003; Zalloua *et al.*, 2004; Kavvoura & Ioannidis, 2005) e doença de Graves (Badenhoop & Seidl, 2003; Furugaki *et al.*, 2004; Yanagawa *et al.*, 2007).

Estudos funcionais têm evidenciado que os polimorfismos das posições -318 e +49, juntamente com os haplótipos resultantes das variantes desses *loci* exercem um efeito funcional diferente na regulação negativa exercida pelo CTLA-4 na ativação celular (Yee *et al.*, 2003). Ligers *et al.* (2001) verificaram que os indivíduos com esclerose múltipla portadores de timina (T) na posição -318 do promotor, e homozigotos para adenina (A) na posição +49 do éxon 1, têm uma expressão significativamente aumentada tanto da proteína CTLA-4 na superfície celular após estimulação quanto do mRNA de CTLA-4 em células não-estimuladas. Experimentos realizados em células T por Wang *et al.* (2002) mostraram que o alelo -318T estava associado a uma alta atividade promotora do gene CTLA-4, considerando a presença do alelo como uma fator protetor para doenças auto-imunes.

Ueda *et al.* (2003) seqüenciaram uma região de mais de 300 Kb contendo o CD28, CTLA-4 e ICOS e dos 108 SNPs verificados apenas esse, na posição +49 do éxon 1 do CTLA-4 (+49A/G), mostrava alteração do aminoácido. Neste mesmo trabalho, que também estudou a região microsatélite (AT)_n na região 3'UTR, os autores sugeriram que nenhum dos polimorfismos estudados para as regiões de CD28 e ICOS estavam associados a doença de Graves. Porém, observou-se que a variante causal da doença estava provavelmente localizada dentro de uma região em desequilíbrio de ligação (LD) contendo o CTLA-4 e a região 5' de ICOS. Cinco outros SNPs do gene CTLA-4 mostraram associação mais forte com a doença de Graves sendo eles denominados CT60, MH30, JO30, JO31 e JO27. Dentre esses, o CT60 (A/G) mostrou associação também com diabetes tipo 1 e hipotireoidismo auto-imune. A redução

dos níveis de mRNA de sCTLA-4 produzidos pelo haplótipo susceptível à doença (CT60 G/G) poderiam reduzir o bloqueio das moléculas B7-1 e B7-2, causando um aumento da ativação celular através de CD28 ou ainda uma menor estimulação dessas moléculas pelo sCTLA-4 em DCs imaturas. As correlações já publicadas entre a ativação de células T *in vitro* e o genótipo de CTLA-4 poderiam ser explicadas pela variação nos níveis de sCTLA-4. Além da verificação de que o alelo G para este SNP provoca a redução do sCTLA-4, verificou-se também a associação deste SNP com a frequência de células T reguladoras, sendo que indivíduos homocigotos para o alelo A apresentavam um aumento na frequência dessas células, relacionando o polimorfismo de CT60 com variações nas respostas imunes adaptativas tanto para antígenos próprios quanto para patógenos (Sowsan *et al.*, 2005). Outro SNP foi identificado no CTLA-4 e encontra-se na posição +1822(C/T) no íntron 1, com relatos de associação com diabetes tipo 1 e a doença de Graves, em desequilíbrio de ligação com o SNP +49(A/G) do éxon 1 (Holopainem *et al.*, 2004).

Estudos subsequentes foram realizados envolvendo os polimorfismos citados para o gene CTLA-4, isolados ou associados, relacionando os mesmos a uma série de outras doenças auto-imunes, incluindo a doença celíaca (Djilali-Saiah *et al.*, 1998; van Belzen *et al.*, 2004; Holopainem *et al.*, 2004), o lupus eritematoso sistêmico (Barreto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), a doença de Addison (Blomhoff *et al.*, 2004), e o hipotireoidismo auto-imune (Akamisu *et al.*, 2000; Tomer *et al.*, 2001; Zalatel *et al.*, 2006). Com relação à psoríase, os resultados obtidos referentes às análises dos polimorfismos em indivíduos portadores dessa doença não mostraram associação alguma (Luszczek *et al.*, 2006). Em recente meta-análise Han *et al.* (2005) confirmaram a associação do polimorfismo +49A/G em pacientes portadores de artrite reumatóide. Já, o mesmo tipo de estudo, realizado por Bagos *et al.* (2007) descarta a participação dos SNPs +49 e -318 em pacientes com esclerose múltipla. Todos esses dados são importantes no entendimento do papel do CTLA-4 na patogênese de doenças auto-imunes (Mäurer *et al.*, 2002; Chistiakov & Turakulov, 2003), e também servem de base para o estudo dos polimorfismos desse gene e sua correlação com outras patologias (**Tabela I**). Recentemente, a verificação da ocorrência de polimorfismos no gene CTLA-4 em doenças tumorais e infecciosas mostraram que o conceito de genótipo protetor e genótipo susceptível, ligado às doenças auto-imunes, não tem o mesmo significado quando há tentativa de correlação com essas outras doenças. Ghaderi *et al.* (2004) verificaram que o genótipo +49(AA), considerado protetor para algumas doenças auto-imunes, está correlacionado com a progressão do câncer de mama, admitindo-se o fato de que indivíduos que possuem o genótipo AA expressam níveis maiores da proteína CTLA-4, regulando negativamente a

resposta imune celular contra as células tumorais. A especulação sobre a perpetuação do alelo G durante a evolução, a despeito da desvantagem da susceptibilidade relacionada à auto-imunidade, seria relacionada a uma defesa mais efetiva contra as doenças infecciosas.

Thio *et al.*, (2004) estudaram a hipótese de os diferentes haplótipos e SNPs do CTLA-4 poderem explicar algumas das diferenças que ocorrem entre os indivíduos no processo de recuperação da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Eles sugeriram que haplótipos contendo o alelo +49G sozinho ou com o alelo -1722C estavam associados com a recuperação da infecção, considerando que eles podem alterar a habilidade do CTLA-4 em regular negativamente a resposta imune. Segundo esses autores o vigor desse mecanismo provavelmente contribui para a resolução da infecção pelo HBV. Ainda, o SNP da posição -318C/T do sítio promotor, na maioria dos relatos, não parece estar associado com doenças auto-imunes (Gough *et al.*, 2005), porém alguns trabalhos sugerem que exista uma forte ligação entre este SNP com o +49 do éxon 1 (Kristiansen *et al.*, 2000; Liegers *et al.*, 2001) e ainda mostram a sua maior frequência em mulheres com papiloma vírus humano (HPV), sugerindo que este SNP possa estar envolvido na persistência do vírus com o possível desenvolvimento do câncer de colo de útero (Su *et al.*, 2007).

Variantes de DNA que alteram mecanismos fisiológicos, bioquímicos e imunológicos envolvidos em uma doença são, por si só, fatores de risco primários naturais. A demonstração de efeitos funcionais associados com uma variante de DNA é um passo importante na tentativa de correlacionar tal variante com a patogênese da doença (Gough *et al.*, 2005). Alterações genéticas exercem impacto em algumas doenças auto-imunes, neoplásicas e infecciosas em humanos e modelos animais. Como o CTLA-4 exerce um papel imunomodulador importante, variações genéticas que promovam uma falha nesse mecanismo são de total relevância no que se refere ao estudo dos mais diversos tipos de doenças. Vários trabalhos sugerem que a região do CTLA-4 é um *locus* importante para as doenças auto-imunes de uma forma geral, tendo focado nos três polimorfismos mais estudados do gene CTLA-4: -318C/T na região do sítio promotor, +49A/G do éxon 1 e (AT)_n na região 3' UTR. Estes três polimorfismos têm mostrado associações com algumas doenças, embora nenhum deles tenha sido identificado como sendo a variante causal. As associações com variantes não-causais provavelmente ocorrem em locais como a região do CTLA-4, onde há um forte desequilíbrio de ligação (King *et al.*, 2003). No entanto, apenas um mapeamento rigoroso do CTLA-4 e dos genes vizinhos pode afirmar essa hipótese (Gough *et al.*, 2005).

Tabela I. Alterações funcionais e algumas patologias associadas ao SNP +49A/G, de forma isolada ou em associação com outros polimorfismos.

SNP +49 (alelo A)

Alterações funcionais:

- * aumento de mRNA de sCTLA-4 (Gough *et al.*, 2005)
- * aumento na expressão da proteína de superfície em associação com o alelo -318T (Ligers *et al.*, 2001)

Patologias associadas:

- * progressão do câncer de mama (Ghaderi *et al.*, 2004)
 - * infecção crônica pelo vírus da hepatite B (Thio *et al.*, 2004)
-

SNP +49 (alelo G)

Alterações funcionais:

- * diminuição da expressão na superfície celular com conseqüente proliferação celular T aumentada (Kouki *et al.*, 2000; Mäurer *et al.*, 2000)

Patologias associadas:

- * Diabetes mellitus tipo 1 (Harbo *et al.*, 1999; Anjos *et al.*, 2002; Kavvoura & Ioannidis, 2005)
 - * Artrite reumatóide (Han *et al.*, 2005)
 - * Lupus eritematoso sistêmico (Lee *et al.*, 2005)
 - * Doença de Graves, em associação com o alelo de 106bp (AT)_n (Nistico *et al.*, 1996)
-

1.4. A paracoccidioidomicose (PCM)

1.4.1. O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e as características gerais da PCM

A PCM é uma doença sistêmica, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, encontrada com maior prevalência na América Latina (Restrepo, 1985). O Brasil é o centro endêmico, possuindo 80% dos casos relatados, sendo os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso os mais afetados. Acometendo principalmente a população rural, provavelmente devido ao contato contínuo com o habitat do fungo, a PCM é a oitava causa de mortalidade por doença crônica (entre as infecciosas e parasitárias) e a primeira entre as micoses sistêmicas no Brasil (Coutinho *et al.*, 2002). Estima-se que existam cerca de 10 milhões de indivíduos infectados na América Latina e que 2% destes desenvolvam a doença (Restrepo, 1985).

A incidência da PCM ocorre numa taxa de 78:1 em adultos do sexo masculino quando comparados àqueles do sexo feminino (Restrepo *et al.*, 1984). O fato desse perfil não ser verificado em indivíduos infectados antes da puberdade e que a exposição ao fungo é

praticamente igual para ambos os sexos levou à hipótese de que os hormônios sexuais femininos interferem na infecção do fungo (Kerr *et al.*, 1984; Restrepo, 1984). De fato, Restrepo *et al.* (1984), Salazar *et al.* (1988) e Sano *et al.* (1992) mostraram a presença de proteínas que atuam como receptores do 17- β -estradiol no citosol das células fúngicas. Esses estudos demonstraram, *in vitro*, que esse estrógeno tem a capacidade de inibir a transição do micélio para levedura. Posteriormente, Aristizabal *et al.* (1998) demonstraram que fêmeas de camundongos infectadas por via intranasal com conídios de *P. brasiliensis* inibiram a transformação dessas células para levedura.

A infecção envolve primariamente os pulmões, local da lesão primária, através da inalação de conídios ou fragmentos de micélios pelas vias aéreas superiores, que na temperatura corpórea sofrem a transição para a forma leveduriforme e podem, ou ser eliminadas pelo sistema imune ou persistir, produzir lesão tecidual e se espalhar pelo resto do organismo (Restrepo, 1985; Newman *et al.*, 1990). O contágio também pode acontecer através de lesões na mucosa oral ou na pele provocadas por trauma. As lesões secundárias freqüentemente aparecem nas membranas mucosas, linfonodos, pele e glândulas adrenais (Domer *et al.*, 1992; Brummer *et al.*, 1993). A evolução e as conseqüências da infecção vão depender de fatores relacionados ao fungo, como virulência e composição antigênica; e do hospedeiro, como características genéticas, imunidade e ao meio ambiente (Restrepo, 1985; Calich *et al.*, 1985 e 1987). Acredita-se que os fungos causadores de micoses sistêmicas utilizem mecanismos de patogenicidade e/ou virulência, como capacidade de adesão, colonização, disseminação, sobrevivência em ambientes hostis e escape dos mecanismos de resposta imune para se estabelecerem no hospedeiro e causarem doença (Franco, 1987). A virulência fúngica é um evento complexo resultante da regulação de diversas vias de sinalização que culminam na ativação de um conjunto de genes em diferentes estágios da infecção, e cuja conseqüência está fortemente associada ao estabelecimento da patogênese. Em *P. brasiliensis*, as adesinas envolvidas na interação do fungo com as células do hospedeiro têm sido correlacionadas à virulência e patogenicidade, destacando-se a glicoproteína 43 (gp43) (Gesztési *et al.*, 1996), uma adesina de 30 kDa (Andreotti *et al.*, 2005) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Barbosa *et al.*, 2006), a gp70 (Grosso *et al.*, 2003), e a paracoccina (Coltri *et al.*, 2006).

A PCM caracteriza-se como uma doença de padrão granulomatoso. O granuloma, a lesão fundamental desta doença, é resultante de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do agente infeccioso que permite a restrição do patógeno prevenindo a sua disseminação pelo organismo (Romani, 1997). Fagócitos mononucleares, plasmócitos,

neutrófilos, eosinófilos e fibroblastos estão presentes no granuloma (de Brito & Franco, 1994), no entanto, a principal célula constituinte é o macrófago, que tem por funções a liberação de substâncias microbicidas (óxido nítrico, radicais superóxido e peróxido de hidrogênio), a apresentação de antígenos e o recrutamento de linfócitos T para a produção de citocinas que variam de acordo com a susceptibilidade do hospedeiro. A atividade de linfócitos T e a resposta granulomatosa são características das formas localizadas da infecção, enquanto que nas formas disseminadas não se observa formação de granulomas epitelióides (Murphy, 1998; Camargo e Franco, 2000). Ao mesmo tempo, o microrganismo pode se beneficiar da formação do granuloma. Por se tratar de um microambiente isolado, o granuloma apresenta um ecossistema especial para o patógeno no hospedeiro. A lesão granulomatosa pode ser um reservatório do qual o patógeno sobrevivente emerge para reativar a infecção após um longo período de latência, rompido por alguma falha no sistema imune (Chan & Flynn, 2004). Silva *et al.* (2008), com a finalidade de compreender a complexa interação entre as células hospedeiras e leveduras de *P. brasiliensis*, analisou a modulação de genes imunoregulatórios após a infecção de macrófagos peritoniais de camundongos por este patógeno. A análise do perfil transcricional dessas células revelou que o patógeno interage com os macrófagos modulando genes envolvidos no processo pró-inflamatório (ex: Irak2, Il7r, Cxcl1), proteínas relacionadas à membrana e fagocitose (ex: Clec1b, Ddr1), regulação da transcrição de citocinas e quimiocinas (ex: Stat1), transdução de sinal (ex: Rasa3, Grb2) e apoptose (Gzma), na tentativa de aumentar a eficiência da resposta imune tanto inata quanto adaptativa contra o fungo.

1.4.2. Formas clínicas da PCM

Existem duas diferentes formas da PCM, a infecção (assintomática) e a doença (sintomática), podendo esta última ser subdividida em aguda (juvenil) ou crônica (adulto). A forma aguda apresenta evolução rápida e lesões multifocais, comumente acometendo jovens de ambos os sexos, com deterioração do estado geral e evidente comprometimento do sistema retículo-endotelial (linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia). A forma crônica é responsável por mais de 90% dos casos de PCM, com evolução lenta e silenciosa, acometendo principalmente adultos do sexo masculino, tendendo a ser localizada, geralmente apresentando lesões granulomatosas pulmonares (Franco *et al.*, 1993). Em 25% dos casos, os pulmões são os únicos órgãos afetados (forma crônica unifocal). Os sintomas respiratórios são inespecíficos e incluem tosse, expectoração, perda de fôlego, sendo que anorexia, febre e perda de peso são também usualmente relatados. Entretanto, em alguns casos, o envolvimento

pulmonar unifocal é silencioso, o que leva os pacientes a procurarem cuidados médicos somente após a disseminação do fungo (via corrente sanguínea ou sistema linfático) ter ocasionado lesões extra-pulmonares (forma crônica multifocal). Nessa forma clínica, os sintomas são variáveis e estão relacionados a mais de um órgão ou sistema, sendo que as lesões frequentemente ocorrem na mucosa oral e nasal, pele, linfonodos e glândulas adrenais (Franco *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

1.4.3. Resposta imunológica da PCM

A defesa imunológica do hospedeiro mamífero contra as micoses sistêmicas é complexa e multifatorial, dependendo de mecanismos inatos e adaptativos (Huffnagle & Deepe, 2003; Romani, 2004). A importância de qualquer um desses mecanismos na resistência às infecções fúngicas sistêmicas pode variar conforme o agente infeccioso, de tal maneira que os fatores da resposta inata teriam uma maior importância na ação contra os fungos oportunistas como *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans* do que contra fungos patogênicos primários como *C. immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis* (Schaffner *et al.*, 1986; Cutler *et al.*, 2007). Nas últimas décadas, diversos trabalhos vêm demonstrando que a resistência aos fungos causadores de micoses sistêmicas como *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis* está associada a uma resposta imunológica celular efetiva, enquanto que a susceptibilidade está associada a uma resposta predominantemente humoral (Romani, 2004, Abbas & Lichtman, 2005). Durante uma resposta imunológica a agentes infecciosos, em muitos casos, não há uma absoluta restrição na ativação de linfócitos Th1 ou Th2. Entretanto, em algumas enfermidades, há uma clara dominância de uma ou outra subpopulação de linfócitos auxiliares, e uma falha na ativação da subpopulação apropriada pode ocasionar resultados desastrosos para o hospedeiro (Cavassani *et al.*, 2006).

Na PCM humana e experimental ocorre uma extensa variação da resposta imunológica, cujo grande espectro de manifestações clínicas depende principalmente do nível de supressão da imunidade celular. Assim, formas severas de PCM são caracterizadas por distúrbios imunológicos como alterações na razão de subpopulações de linfócitos T, DTH, prejudicada, produção de citocinas que inibem o desenvolvimento de uma resposta imune celular efetiva e supressão da proliferação de linfócitos T (Bocca *et al.*, 1998; Campanelli *et al.*, 2003; Cavassani *et al.*, 2006). A resposta imune celular é a principal defesa contra o *P. brasiliensis* sendo que a resistência à infecção está relacionada à presença do IFN- γ e outros tipos de citocinas Th1 como IL-2 e também IL-10, enquanto que a susceptibilidade à infecção

está relacionada ao padrão celular Th2, com a presença das interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 (Bernard *et al.*, 2001; Bozzi *et al.*, 2004).

Mamoni *et al.* (2002) observaram no soro de pacientes com a forma aguda e a forma crônica multifocal um padrão de citocinas do tipo Th2 (IgE anti-GP-43, IgA, IgG4 e eosinófilos aumentados) quando comparados com pacientes portadores da forma crônica unifocal. Posteriormente Mamoni *et al.* (2006) ampliaram seus estudos por meio da avaliação da expressão intracelular de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-10, IL-12 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com a forma aguda e forma crônica da doença, além de indivíduos sensibilizados para o fungo (Pb infecção). Um perfil condizente com uma resposta predominantemente Th1 foi encontrado nos indivíduos sensibilizados. Esse perfil era caracterizado por um número elevado de linfócitos T expressando IFN- γ , TNF- α , IL-2, com baixos níveis dessas células positivas para IL-10. Apesar de uma polarização clara Th2 não ter sido evidenciada nos pacientes com a forma aguda neste trabalho, uma baixa produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de um grande número de células expressando IL-10 foram encontradas.

Bozzi *et al.* (2004), estudando a resposta imune celular em pacientes com PCM não-tratados e em diferentes períodos de tratamento, verificaram que os níveis de IFN- γ aumentam e os de IL-4 diminuem com o tratamento. Além disso, verificaram que linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no grupo de indivíduos não-tratados mostraram expressão reduzida da molécula co-estimulatória CD28 após estimulação antigênica, e uma presença aumentada de células B expressando B7-2 em todos os grupos, que concorda com a grande quantidade de anticorpos específicos não-protetores encontrados nos indivíduos com PCM, além do possível papel de B7-2 em sinalizar para a produção de IL-4 e contribuir com o fenótipo celular Th2. Este mesmo trabalho verificou ainda a expressão celular de CTLA-4 e não encontrou diferenças significativas da sua expressão nas diferentes fases do tratamento dos indivíduos com PCM, apesar de constatar uma regulação nos níveis de CD4⁺CD28⁺ com o tratamento. Outros estudos envolvendo o fungo *P. brasiliensis* e a PCM realizados por Cavassani *et al.* (2006) verificaram que a hiporesponsividade imune celular presente na PCM está relacionada a alguns fatores como a secreção alterada de citocinas, a apoptose de células T induzida por Fas-FasL e também pela participação do CTLA-4. Observa-se uma maior expressão dessa proteína em pacientes portadores de PCM do que em indivíduos controles. Além disso, a presença de células Treg (que expressam quantidades aumentadas de CTLA-4) no sangue e nas lesões de pacientes com a forma crônica de PCM sugere uma regulação da resposta imune

sistêmica e local nessa doença. Masteller *et al.* (2000) mostraram que o domínio citoplasmático de CTLA-4 contribui na regulação do balanço Th1/Th2 da resposta imune. Isso poderia ocorrer através da habilidade do domínio citoplasmático iniciar a transdução de sinal ou ainda como resultado da sua habilidade em reposicionar o CTLA-4 para sítios específicos durante a ativação da célula T. Greenwald *et al.* (2001), utilizando camundongos nocauteados para CTLA-4, sugeriram um desvio da resposta imune para o perfil Th2, indicando que CTLA-4 normalmente opõe-se ao fenótipo Th2. Campanelli *et al.* (2003) verificaram que o bloqueio simultâneo de Fas e CTLA-4 resulta em aumento significativo da proliferação celular em pacientes com PCM, apontando seu envolvimento na modulação da resposta imune. Esses autores sugerem que um protocolo terapêutico envolvendo o bloqueio de CTLA-4 poderia aumentar a proteção mediada por células T nesses pacientes.

A produção de citocinas está sob controle genético, e variantes alélicas de genes de citocinas estão associadas a uma maior ou menor produção destas, o que poderia indicar susceptibilidade ou resistência à diversas doenças, inclusive às infecciosas (Lio *et al.*, 2002; Cipriano *et al.*, 2005). Dessa forma, Bozzi *et al.* (2006) avaliaram a frequência dos polimorfismos de SNPs conhecidos em duas importantes citocinas presentes no soro de pacientes com PCM, a IL-10 (-1082 G/A) e o TNF- α (-308 G/A). Seus estudos indicaram que a estimulação de células de pacientes com PCM portadores do fenótipo A+ (genótipo GA ou AA) apresentaram um aumento de células produtoras de TNF- α em comparação às células produtoras de IL-10, sugerindo que a avaliação genética dos pacientes com PCM seria uma ferramenta válida em sua terapia. É importante ressaltar que, até o momento, não existem dados na literatura sobre a análise de polimorfismo no gene CTLA-4 em pacientes com PCM, objeto deste estudo.

1.5. Análise populacional e ancestralidade

Durante as últimas décadas as causas genéticas de várias doenças complexas (multifatoriais) têm sido enfatizadas para um melhor entendimento da sua patogênese, com o objetivo de desenvolver estratégias preventivas, ferramentas diagnósticas e tratamento (Cardon & Palmer, 2003). Existem alguns métodos geralmente usados para a detecção de genes que contribuem para a susceptibilidade ou resistência a doenças multifatoriais e dentre eles encontram-se os estudos de associação (Tsuchiya *et al.*, 2002).

Os estudos de associação envolvem a seleção de um gene candidato e o encontro de alelos polimórficos predisponentes para a doença na população (Cardon & Palmer, 2003). Em geral, este método considera uma variedade de informações como os mecanismos conhecidos

do início da doença e a sua patologia, resultados de estudos de ligação em humanos e modelos animais e os fenótipos de animais nocauteados e transgênicos. Examina-se a variação encontrada e se existe uma diferença significativa entre pacientes (casos) e indivíduos-controle, em termos de frequência alélica ou genotípica. Esse tipo de estudo possui um alto poder de detecção, porém esse método pode apresentar resultados espúrios, associações falsamente positivas ou negativas quando o *background* genético dos casos e controles for diferente (Tsuchiya *et al.*, 2002).

O conceito de variação genética levou o matemático inglês Godfrey Hardy e o médico alemão Wilhelm Weinberg a desenvolverem o princípio matemático que é conhecido como equilíbrio de Hardy-Weinberg, o qual indica que, sob determinadas condições, após uma geração de acasalamentos aleatórios, as frequências genotípicas em um único loco de gene tornar-se-ão fixas em um valor particular no equilíbrio, sendo então a consequência direta da segregação de alelos na meiose dos heterozigotos (Hartl & Clark, 1997). É sabido que as frequências alélicas variam amplamente dentro e entre as populações, independentemente da doença. Essa diferença nas frequências surgiu porque cada população tem um histórico genético e social, e então os padrões ancestrais de migração geográfica provocam diferenças nas frequências alélicas entre indivíduos, que estão espalhadas por todo o genoma, incluindo muitos genes de relevância médica. Quando casos e controles têm diferentes frequências alélicas atribuídas ao *background* populacional então o estudo apresenta uma estratificação populacional, sendo uma das razões mais comumente citadas para resultados de associações genéticas não-reprodutíveis (Tsuchiya *et al.*, 2002). Baseando-se neste fato, instituições públicas e privadas juntaram-se para fundar o Consórcio Internacional de Mapas de Haplótipos (HapMap), que foi criado a partir do seqüenciamento do genoma humano e teve como objetivo inicial guiar o desenho e análise de estudos de associação genética em medicina pela organização de um banco de dados público para os polimorfismos mais comuns no genoma humano, os SNPs, e prover informações necessárias para os estudos genéticos de doenças complexas (Altshuler *et al.*, 2005). Desta forma, nos estudos de associação deve-se considerar a análise de ancestralidade na população estudada para eliminar-se a possibilidade da associação não ser uma consequência do *background* genético de casos e controles, mas sim do polimorfismo do gene candidato escolhido para análise.

Considerando a ocorrência de variação da estrutura genética da população de acordo com a distribuição geográfica (Rosenberg, 2002), existe a chance de se encontrar *loci* com diferenças extremas de frequência alélica entre os grupos populacionais diversos, que podem caracterizar a ancestralidade individual ou determinar a contribuição de cada população

parental em grupos miscigenados recentemente. Para essa finalidade, marcadores genéticos que capturam essas informações de frequência alélica em duas ou mais populações distintas vêm sendo amplamente explorados pela comunidade científica e são designados marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) (Shriver *et al.*, 1997). O marcador bi-alélico ideal para distinguir uma população de outras populações, ou estimar proporções de ancestralidade em amostras miscigenadas, seria aquele em que um alelo (X) se encontre altamente fixado para uma população enquanto o outro alelo (x) se encontre fixado para as demais, fazendo com que a diferença de frequência alélica (δ) seja igual a 1,0. No entanto, tais *loci* são relativamente raros (Pfaff *et al.*, 2004). A diferença de frequência alélica atualmente indicada para um AIM de grande informação e correta atribuição é $\delta \geq 0,60$ (Hoggart *et al.*, 2003; Rosenberg *et al.*, 2003).

Nos trabalhos onde a população brasileira é objeto de estudos de associação genética ou estudos de genética populacional o risco de heterogeneidade é muito alto, mesmo com o cuidado de se agrupar indivíduos por características físicas que possam determinar a origem africana ou europeia, por exemplo (Parra *et al.*, 2003). Esta heterogeneidade é causada, em sua maioria, pelo histórico de miscigenação recente e contínua, ao longo de 500 anos, entre africanos, europeus e ameríndios. Tal fato reforça a necessidade de atentar-se aos riscos de resultados espúrios devidos à estratificação. Assim, a utilização de marcadores SNPs informativos de ancestralidade em metodologias otimizadas de minisequenciamento tornam-se necessários para a aplicação da associação estruturada nos estudos da população brasileira.

2. JUSTIFICATIVA

Como mencionado anteriormente, as alterações na expressão do gene CTLA-4 e sua capacidade de regulação da resposta imune em doenças infecciosas podem estar correlacionadas com o polimorfismo existente na sua seqüência gênica. No caso da PCM, por meio da verificação: a) da hiporesponsividade imune celular presente na PCM; b) da expressão aumentada da molécula de CTLA-4 em pacientes com esta doença; c) do aumento da concentração de CTLA-4 solúvel; d) do conhecimento das alterações provocadas na resposta imune por este aumento, justifica-se a análise de polimorfismos deste gene em pacientes com PCM.

A associação de polimorfismos no gene CTLA-4 com a ocorrência de diferentes patologias fortalece a necessidade de um melhor entendimento do *background* genético do indivíduo com PCM e sua importância no curso da infecção. Desta forma, a avaliação da presença de polimorfismo no sítio promotor (-318C/T) e no éxon 1 (+49A/G) poderá fortalecer a hipótese do envolvimento de diferentes haplótipos influenciando o desenvolvimento da PCM. Adicionalmente, se forem constatadas diferenças entre os indivíduos controle e com PCM, os dados poderão ser utilizados como referência para futuros estudos e também para a criação de um protocolo de atendimento dos pacientes com PCM. Neste protocolo as variações genéticas do CTLA-4 poderão ser consideradas dentro do plano de tratamento destes pacientes, aumentando desta forma a possibilidade de tornar o tratamento desta micose sistêmica mais eficaz.

3. OBJETIVOS

Investigar a associação do polimorfismo do gene CTLA-4 entre indivíduos com PCM e indivíduos não-infectados, nas posições -318 do sítio promotor e +49 do éxon 1. Além disto, para afastar a possibilidade da ocorrência do polimorfismo estar relacionada à ancestralidade e não à ocorrência de infecção, foi também avaliada a estrutura populacional das amostras analisadas.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração de DNA genômico de pacientes e controles a partir de amostras sanguíneas.
- Amplificação por reação de PCR das regiões -318 e +49 usando oligonucleotídeo específico.
- Seqüenciamento dos produtos de PCR e análise dos SNPs nos eletroferogramas gerados pelo seqüenciador automático.
- Análise da estrutura populacional visando avaliar a relação dos fenótipos estudados com a estratificação através de reações de PCR em sistema multiplex, utilizando oligonucleotídeos específicos e genotipagem automatizada baseada em extensão de base única (miniseqüenciamento).
- Análise estatística dos resultados obtidos através dos testes de χ^2 (Qui-Quadrado) e OR (*Odds Ratio*).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras de sangue

Os indivíduos incluídos neste estudo assinaram um termo de consentimento após terem recebido orientações sobre os objetivos da pesquisa, e também responderam a questionamentos relevantes para este estudo. Foram colhidos aproximadamente 8 ml de sangue de cada indivíduo, distribuídos em dois tubos, um deles contendo o anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) e o outro tubo sem adição de anticoagulante. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob registro CEP-FM 065/2004.

4.1.1. Pacientes com PCM

O grupo de pacientes com PCM foi constituído por 74 indivíduos. Desse total, 9 amostras de sangue foram colhidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB), 13 amostras de sangue foram colhidas no Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia (HDT) com o auxílio da Dra. Ana Joaquina Cohen, 29 amostras de DNA foram cedidas pelo Dr. Alfredo Miranda de Goes da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e 23 amostras de DNA foram cedidas pela Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta, da Universidade de Campinas (UNICAMP). Foram incluídos no estudo pacientes do sexo masculino e feminino, com idades variando entre 13 e 70 anos, não-relacionados (sem qualquer grau de parentesco), diagnosticados clínica e/ou laboratorialmente com alguma das formas clínicas conhecidas de PCM.

4.1.2. Controles

O grupo controle do estudo foi constituído de 76 amostras de voluntários saudáveis, sem histórico de PCM e/ou quaisquer doenças auto-imunes, do Hospital Geral de Brasília (HGeB), Exame Medicina Laboratorial, Laboratórios de Biologia Molecular e de Patologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), também de ambos os sexos, não-relacionados (sem qualquer grau de parentesco), com idades variando entre 9 e 75 anos.

4.2. Extração de DNA

O DNA das amostras de sangue foi obtido pelo método de extração por fenol-clorofórmio (adaptado de Sambrook & Russel, 2001) ou, alternativamente, por utilização do

kit comercial GeneCatcher gDNA Blood Kits (Invitrogen™) seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.1. Extração por fenol-clorofórmio

Um volume de aproximadamente 4 ml de sangue foi colocado em tubo sem anticoagulante e centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante (soro) foi separado e o coágulo obtido, contendo a porção celular sangüínea, foi utilizado para a extração do DNA. O coágulo foi transferido para um tubo Falcon (50 ml) onde foram acrescentados 30 ml de Tampão de Lise (MgCl₂ 5mM; NaCl 1mM; Tris-HCl 10mM). A mistura foi agitada em vórtex, colocada em banho-maria 37°C por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento novamente tratado com Tampão de Lise sob as condições descritas anteriormente por mais duas vezes. Em um tubo a parte foram adicionados 0,006g de DL-ditiotretiol (DTT) em 1 ml de Tampão de Extração (NaCl 100mM; Tris-HCl 1mM; EDTA 0,5mM; SDS 2%) e então 900 µl desta mistura foram adicionados ao sedimento anteriormente obtido, juntamente com 22,5 µl de Proteinase K (10 mg/ml). A mistura foi agitada em vórtex e incubada em banho-maria 56°C *overnight*. Após esse período, o material obtido foi separado em três tubos *ependorfs* com capacidade de 1,5 ml e, a cada alíquota, 300 µl de uma solução contendo Fenol/Clorofórmio (1:1, v:v, pH 7.9) foram adicionados. A mistura obtida foi agitada em vórtex até que obtivesse aparência leitosa e foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram cuidadosamente transferidos para novos tubos *ependorfs* e então 600 µl de isopropanol (PA) foram adicionados a cada tubo, os quais foram suavemente homogeneizados por inversão. Os tubos foram submetidos a uma temperatura de -20°C por 20 minutos e então centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e 600 µl de álcool 70° foram adicionados aos *pellets* obtidos, centrifugando-se os *ependorfs* a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os *pellets* foram ressuspensos com 10 µl de Tampão TE pH8.0 (EDTA 1mM; Tris-HCl 10mM) e seus volumes foram todos reunidos em um único tubo *ependorf*. Uma alíquota de 1 µl foi utilizada para corrida eletroforética em gel de agarose 1% para a verificação da qualidade do material obtido.

4.3. Quantificação dos DNAs

Os DNAs extraídos foram quantificados no "GeneQuant™pro" (GE Healthcare) ou, alternativamente, tiveram suas concentrações estimadas com Low DNA Mass Ladder

(GIBCO BRL) em gel de agarose 1% (p/v) corado com EtBr (0,5 µg/ml). Usou-se tampão de corrida TBE 0,5X (EDTA 20mM; Ácido Bórico 890 mM; Trizima Base 890 mM, pH 8.0) e voltagem de corrida 60 V/cm². Para a corrida das amostras foi usado tampão de amostra (Azul de Bromofenol 0,1%; Glicerol 50%; Xileno Cianol 0,1%).

4.4. Genotipagem dos SNPs -318C/T e +49A/G

Para a genotipagem destes SNPs foi utilizada a técnica de PCR para a amplificação das regiões de interesse, seguida pelo seqüenciamento automático do produto amplificado no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare) com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente.

Tabela II. Condições utilizadas para amplificação das regiões do sítio promotor e éxon 1 do CTLA-4 com o Par 1 de oligonucleotídeos (P1F e P1R).

Reagentes	Concentrações finais	Volumes
FideliTaq™	1X	25,0 µl
P1Forward 10 µM	0,10 µM	0,50 µl
P1Reverse 10 µM	0,10 µM	0,50 µl
DNA	20ng/µl	1,00 µl
H ₂ O	—	23,0 µl
Volume total		50,0 µl

O desenho dos oligonucleotídeos (P1Forward 5' AGGCTCAGAAGTTAGCAGCCT 3' e P1Reverse 5' CCCTGGAATACAGAGCCAGC 3' - Integrated DNA Technology - IDT) utilizados para a PCR foi baseado na seqüência com código de acesso M74363 do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), representado na **Figura 4**. A referida seqüência compreende a região do CTLA-4 onde estão localizados os SNPs -318C/T do sítio promotor e +49A/G do éxon 1. As amostras de DNA foram amplificadas de acordo com as condições mostradas acima na **Tabela II**. O programa de PCR consistiu em um primeiro passo de desnaturação 95°C/1 minuto; 28 ciclos de 95°C/20 segundos, 62°C/1 minuto, 72°C/1 minuto e 30 segundos; e uma extensão final a 72°C/5 minutos.

```

CTGCAGAGTCTCCTCTGCTGTGCTGAGGTGTGGACAATGGGAAACCATGGACGGACTGGAGTAGGCAAAT
GTCATATTCCTGTTGCAACTGTCTGTTTGCATGTCAGCCTTCTAGAAGCCCCCTTAAGGTATCAACTATG
TTTTTGTGTTTGTGCATCATTCAATCCTAAGTGCACAGAATTCGGGCATATTACAGGTTCCCCATAAAATGT
TTCTTTCTTTATTTAAAATGTATGAAAACCTCTCCAGATTTAAGGAAGGTCCCTCAATGTTTCAAATTCCTTT
TGTTAGATCAGTTGGTCCCTGTCTACAGCTGTCACAAAATTTAAGGACTCTGGTTATATTTAATCTTCACTT
TTGAATTTTCTGCTTGAAAAATTTGTATTAGAAAAAAAAGTCTATCCTTTTATGGACGGCTCTAATCTCT
TGAATCATTTGGGTTGGCTTTTCTTTGGACCTTCTTCAACTCTGTTTTGTCTCTGTTGAGTTAAGGCTTT
TAAGAACACCTGAATTCTTTCCCTTCTGCAAAAACAGAGGCAGCTTCTTTTCCGCCTATTTTTCAGTTTTATT
TCTTGTGATTTTAGTTTTTTTTCTCTTAACCAAATGCTAAAATGGATTTAGGAGAAAATAAATTTATTTGTAA
AGCTGTCAAGGGACCATTAGAAGGATGGTGCTTACAGATAGAATACAGTTTTTATTAATGATGCCTAGA
CAATCCTGCCATTACGCAAGGCTCAGAAGTTAGCAGCCTAGTAGTTTGAGATGTCAATGAAATGAATTGG
ACTGGATGGTTAAGGATGCCCAGAAGATTGAATAAAAATTTGGGATTTAGGAGGACCCCTGTACTCCAGGAA
ATTCTCCAAGTCTCCACTTAGTTATCCAGATCCTTAAAGTGAACATGAAGCTTCAGTTTCAAATTTGAATA
CATTTTCCATCCATGGATTGGCTTGTGTTTGTTCAGTTGAGTGCTTGAGGTTGTCTTTTCGACGTAACAGC
TAAACCCACGGCTTCTTTCTCGTAAAACCAAAAACAAAAAGGCTTCTATCAAGAGCCTTCTGTGTGTG
CACATGTGTAATACATATCTGGATCAAAGCTATCTATATAAAGTCCCTTGATTCGTGTGGGTTCAAACAC
ATTTCAAAGCTTCAGGATCCTGAAAGGTTTTGCTCTACTTCTGAAGACCTGAACACCGCTCCCATAAAG
CCATGGCTTGCTTGGATTTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCTTCCAGGACCTGGCCCTGCAC
TCTCCTGTTTTTTCTTCTTCTTCCATCCCTGTCTTCTGCAAAAGGTGAGTGAGACTTTTGGAGCATGAAGATG
GAGGAGGTGTTTCTCCTACCTGGGTTTCATTTGTTTTCAGCAGTCAAGGGCAGTCATTTATAGCAAAGCCA
GAAGTTAAAGGTAATAACTCAATCTGGCTTGCTGGCTCTGTATTCCAGGGCCAGCAGGGAGCAGTTGGGC
GCCAGAATAAGGCAAAAGAGATAGCTCGAGAACAGAGCGCCAGGTATTTAGTAGGGGCTTTCATGAATGCA
TGTGAGTTGGTTTAGTAGAGAGACACAGGCAATTTAGACCCCTTCTATGAGACTGGAAGTGATTTAAGAG
GGAAAGGATAGCCATAGTAATGAATACATTTGAGCTGGGTTTCAGGATGAGCTC

```

Figura 4. Sequência representativa do código de acesso M74363 do GenBank. Em azul estão representados os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação das regiões do sítio promotor e do éxon 1 do CTLA-4. Em vermelho estão sinalizadas as posições dos SNPs -318 e +49, respectivamente.

4.5. Análise Populacional

4.5.1. Marcadores informativos de ancestralidade (AIMs)P

Foram utilizados neste trabalho 16 marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) anteriormente selecionados na literatura (Shriver *et al.*, 2003; Smith, 2004) pelo grupo do Prof. Dr. Rinaldo Welerson Pereira (UCB – Brasília – DF). Esses AIMs são caracterizados por marcadores com eixo de diferença de frequência alélica (δ) entre Europeus e Ameríndios, Europeus e Africanos e Ameríndios e Africanos.

A **Tabela III** mostra as informações da posição genética, da descrição alélica, da frequência alélica para um dos alelos e da diferença de frequência alélica para cada um dos 16 marcadores nas três populações parentais. A **Tabela IV** mostra os desenhos e os tamanhos dos oligonucleotídeos utilizados na PCR e dos oligonucleotídeos do minisequenciamento (descrito no item 4.5.4.).

Além das amostras de pacientes (43 indivíduos) e controles (70 indivíduos), dados de genótipos de três populações alocadas no HapMap foram utilizadas nas análises: Africanos Sub-Saarianos (120 indivíduos), Ameríndios (69 indivíduos) e Euro-Americanos (78 indivíduos).

Tabela III. Descrição dos 16 marcadores informativos de ancestralidade estudados: suas posições gênicas, seus alelos e as frequências do alelo 1 nas populações parentais Européia (EUR), Africana (AFR) e Ameríndia (AMR). Descrição da diferença de frequência alélica (δ) entre as três populações parentais arranjadas par a par. Fonte: Lins, (2007).

<i>loci</i>	Posição gênica	Alelos		Freq. alelo 1					
		1	2	EUR	AFR	AMR	δ AFR/ EUR	δ AFR/ AMR	δ AMR/ EUR
rs2065160 (TSC)	1q32	C	T	0,078	0,512	0,850	0,434	0,336	0,770
rs1129038	15q13	C	T	0,224	0,995	0,983	0,771	0,012	0,759
rs1426654	15q21	C	T	0,000	0,980	0,950	0,980	0,030	0,950
rs0727563	22q13	C	T	0,260	0,820	0,950	0,560	0,130	0,690
rs0734780	15q26	C	T	0,070	0,710	0,854	0,640	0,144	0,787
rs4305737	6q24	A	G	0,250	0,929	1,000	0,679	0,071	0,750
rs1240709	1p36.3	A	G	0,794	0,036	0,103	0,758	0,067	0,691
rs3796384	3p14	C	G	0,154	0,783	0,875	0,629	0,092	0,721
rs2278354	5p15.2	G	T	0,120	0,704	0,839	0,584	0,135	0,719
rs3176921 (CRH)	8q13	G	A	0,073	0,682	0,017	0,609	0,665	0,056
rs2814778 (FYNULL)	1q23	C	T	0,998	0,001	1,000	0,997	0,999	0,002
rs0803733	9q33	C	T	0,880	0,015	0,411	0,865	0,396	0,469
rs285 (LPL)	8p21	G	A	0,508	0,029	0,558	0,479	0,529	0,050
rs1800404 (OCA2)	15q13	G	A	0,254	0,885	0,552	0,631	0,333	0,298
rs6034866	20p12	G	A	0,917	0,051	0,857	0,866	0,806	0,060
rs7349	10p11.2	G	A	0,939	0,016	1,000	0,923	0,984	0,061

Tabela IV. Descrição das seqüências e dos tamanhos dos oligos de PCR (F e R) e dos oligos de miniseqüenciamento (S). Fonte: Lins, (2007).

Oligos	Seqüência	Direção do Iniciador	Tamanho (bp)
TSC-F	CTGCTGTGCTAGCTGCTGAT	direto	20
TSC-R	GCTGTGAGGACGTCAAACCT	reverso	20
TSC-S	gact CCTCTCGATGAGTAAATATGGG	reverso	26
rs1129038-F	CAGCAGCGACGATTCA	direto	20
rs1129039-R	ATCACGGCCAGTCAGTCTCT	reverso	20
rs1129040-S	(gact)5 ACAGTCTACACAGCAGCGAG	reverso	40
rs1426654-F	TTCAGCCCTTGGATTGTCTC	direto	20
rs1426655-R	AATTGCAGATCCAAGGATGG	reverso	20
rs1426656-S	gact GACCGCTGCCATGAAAGTTG	reverso	24
rs0727563-F	CACGGTATCCAGAACAAGCA	direto	20
rs0727564-R	ACACTGCCTCCCAATAACCA	reverso	20
rs0727565-S	(gact)3 ACCAGGCTGTCTCAAATAAC	reverso	32
rs0734780-F	GATGGCACTGACCTTCCTTC	direto	20
rs0734781-R	AGGTTGCAGTGAGCCAAGAT	reverso	20
rs0734782-S	(gact)4 CCCAGCAGTGGGTATCAC	direto	34
rs4305737-F	TGGTGAACACGTGAGGTTACA	direto	21
rs4305737-R	TGGAGAAACCAGTCTCACCTG	reverso	21
rs4305737-S	(gact)3 AATTGAGGCCCTGAAGA	direto	30
rs1240709-F	ATCCTATCTGGGTGGCACAG	direto	20
rs1240710-R	CAGCAGTCAGCTCAGTTCAGTCAGG	reverso	20
rs1240711-S	(gact)5 ATGTGGACACGGGTGAGGGA	direto	40
rs3796384-F	GCCAATGTCGGAAGGATTAC	direto	20
rs3796385-R	GCTAGCCAATGTGCAAGACA	reverso	20
rs3796386-S	(gact)6 CGTTCTTCTCTCCATTCAGA	direto	44

CRH-F	TTTGTGCCCTTCACTATGG	direto	20
CRH-R	CCATATTTCTGCCTGGAAAA	reverso	20
CRH-S	(gact)3 TGCAGAAGCAAGGCCAATAA	reverso	32
FYNUL-F	TCACCCTGTGCAGACAGTTC	direto	20
FYNUL-R	GTGGGGTAAGGCTTCCTGAT	reverso	20
FYNUL-S	(gact)2 GACCTCATTAGTCCTTGGCTCTTA	reverso	32
LPL-F	CAGTGGGTTCAAGGCTCTGT	direto	20
LPL-R	AACAACAACAAAACCCACACA	reverso	20
LPL-S	(gact)4 GACAACAAAACCCACAGCT	reverso	36
OCA-2-F	CAGGCTTTCGTGTGTGCTAA	direto	20
OCA-2-R	TGAGCTGACATCCCCTGAG	reverso	20
OCA-2-S	(gact)2 GGTGCACAGAACTCTGGC	direto	26
rs6034866-F	TTGTGAGTCAAGGCAAGCTG	direto	20
rs6034866-R	TAGCTAGGGCAGGAGGTGAA	reverso	20
rs6034866-S	(gact)7 TGTGAGTCAAGGCAAGCTGG	direto	48
rs7349-F	GCAATTGGTTCTCCTGCATT	direto	20
rs7349-R	GAAATGAGAGTTGTATGGTTAGGC	reverso	24
rs7349-S	(gact)5 AAATGAGAGTTGTATGGTTAGGCT	reverso	44
rs0803733-F	TCCCCAAGAGTTCAACCAAC	direto	20
rs0803733-R	AACCTTAGGCTTGAGCATGG	reverso	20
rs0803733-S	(gact)7 ATGTCATTGTGGAGGAGATA	reverso	48

4.5.2. Amplificação das seqüências alvo

Os dois painéis foram co-amplificados em uma reação de volume final igual a 12,5 µl, contendo: 10 a 50 ng do DNA molde; 0,25 µM de cada oligonucleotídeo (Forward e Reverse) em multiplex; dNTP 0,25 µM; MgCl₂ 1,5 µM; BSA (albumina sérica bovina) 0,16mg/ml; Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) 1U; Tampão Taq Platinum (Invitrogen) 1X e H₂O Milli-Q qsp. O programa de PCR utilizado consistiu em um *two-step touchdown* PCR sugerido por Lins (2007) da seguinte forma: 95°C/3 minutos; 26 ciclos de 95°C/30 segundos, 65°C/35 segundos decrescendo até 52°C (-0,5 °C por ciclo); em seguida, 20 ciclos de 94°C/30 segundos, 52°C/30 segundos e uma extensão final de 72°C/12 minutos. O método de *touchdown* consiste na redução seriada das temperaturas de anelamento a cada repetição ciclo, reduzindo a perda de anelamento por parte de alguns oligonucleotídeos que possuam temperaturas de anelamento diferenciadas (Don *et al.*, 1991). A verificação da presença dos amplicons (visualização de 2 ou 3 bandas com aproximadamente 300 bp cada) foi feita aplicando-se 3 µl do produto de PCR em gel de agarose 2% .

4.5.3. Tratamento enzimático com EXOI / SAP

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a um tratamento enzimático para a eliminação do excesso de oligonucleotídeos e dNTP através das enzimas EXOI (Exonuclease I – New England BioLabs) e SAP (Fosfatase Alcalina de Camarão - USB). A reação foi realizada nas seguintes condições: 3 µl do produto de PCR acrescidos de EXOI 1U, SAP 0.9U e Tampão de SAP 0,5X. A mistura foi colocada em termociclador e submetida às seguintes condições: 37°C/90 minutos e 80°C/20 minutos.

4.5.4. Reação de Miniseqüenciamento

Amplificações de regiões genômicas por oligonucleotídeos são mecanismos robustos e flexíveis de discriminação alélica e requerem quantidades muito pequenas de DNA e de oligos (Sambrook & Russel, 2001). A reação de extensão ou miniseqüenciamento é a mais difundida para a detecção de SNPs em média escala, e baseia-se na habilidade da DNA-polimerase em incorporar um dideoxiribonucleotídeo fosfato (ddNTP) específico complementar à seqüência do molde de DNA (Kwok, 2001). Assim, um dideoxiribonucleotídeo fosfato marcado com fluorescência é estendido a um iniciador não-marcado, anelado adjacente ao sítio da mutação de interesse (Syvanen *et al.*, 1999). A

especificidade e sensibilidade dessa detecção dependem, principalmente, da amplificação por PCR da região do DNA que contém a variável de interesse.

A genotipagem dos SNPs foi realizada utilizando o sistema SNaPshot™ Multiplex System (Applied Biosystems), em uma reação de volume final igual a 5 µl contendo: 1 µl de SNaPshot™ Kit reaction mix; 1,5 µl de uma mistura de oligos S (0,1 a 0,3 µM cada); 1,25 µl do produto de PCR purificado e H₂O Milli-Q qsp. O programa de PCR consistiu de: 96°C/2 minutos; 30 ciclos de 96°C/20 segundos, 55°C/20 segundos decrescendo até 40°C (-0,5°C por ciclo) e extensão a 60°C por 30 segundos; em seguida, 15 ciclos de 96°C/15 segundos, 40°C/20 segundos e 60°C/30 segundos.

4.5.5. Tratamento enzimático com SAP

Os produtos do miniseqüenciamento foram submetidos a um novo tratamento enzimático para a remoção do excesso dos ddNTPs fluorescentes. A reação foi realizada adicionando-se 0,5U de SAP e 0,5X de Tampão de SAP ao produto do miniseqüenciamento. Em seguida, essa mistura foi levada ao termociclador, onde foi submetida às seguintes condições: 37°C/60 minutos e 85°C/15 minutos.

4.5.6. Desnaturação

Em 1 µl de produto purificado acrescentou-se 8,85 µl de formamida altamente deionizada e 0,15 µl de Liz 120 Size Standard (Applied Biosystems). A mistura foi submetida a 95°C por 3 minutos e, imediatamente após, a uma temperatura de -20°C por 3 minutos.

4.5.7. Eletroforese em seqüenciador automático

A eletroforese do material desnaturado foi realizada no seqüenciador automático de DNA ABI 3130 xl Genetic Analyser (Applied Biosystems), em polímero ABI 3700 POP-6™. As corridas foram analisadas com o programa GeneScan Analysis 3.7 e os eletroferogramas foram analisados, para cada grupo de iniciadores, no programa Genotyper 3.7 (Applied Biosystems, EUA).

4.6. Análises estatísticas

As freqüências alélicas e genóticas de pacientes com PCM e indivíduos-controle para os SNPs -318 e +49 foram comparadas e a significância dos desvios foi verificada através do teste de Qui-Quadrado utilizando-se o programa “SPSS Data Editor”. Valores de $P < 0,05$ se encontrados, indicariam associação positiva da variante com a doença. Foi

realizado o cálculo de OR (“*Odds Ratio*”) e determinado o intervalo de confiança (IC 95%) de OR através do programa “Med Calc”. O OR reflete a força da associação de um determinado fator com o desenvolvimento de algum evento ou doença.

A estimativa dos haplótipos, suas frequências e o desequilíbrio de ligação entre os dois SNPs -318 e +49 foram obtidas utilizando-se o algoritmo EM (maximização das expectativas) implementado no programa “Haploview” (Barrett *et al.*, 2005). Ainda com este programa buscou-se a associação entre haplótipos, pacientes e controles, a qual também é verificada através do teste de Qui-Quadrado.

Para avaliar a existência de estruturação populacional (ancestralidade) foi usado o programa “Structure 2.1” (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa modela a estrutura populacional, miscigenação populacional e miscigenação individual utilizando inferência Bayesiana a partir dos dados de genótipos.

5. RESULTADOS

5.1. Análise do DNA genômico das amostras de pacientes e indivíduos controle

A qualidade das amostras de DNA extraídas de pacientes com PCM e controles foi verificada em gel de agarose 1%. O perfil eletroforético demonstrou a integridade das amostras de DNA como observado na **Figura 5**. As amostras foram quantificadas e tiveram suas concentrações ajustadas para serem utilizadas nas reações de PCR com o par 1 de oligonucleotídeos (oligo 1).

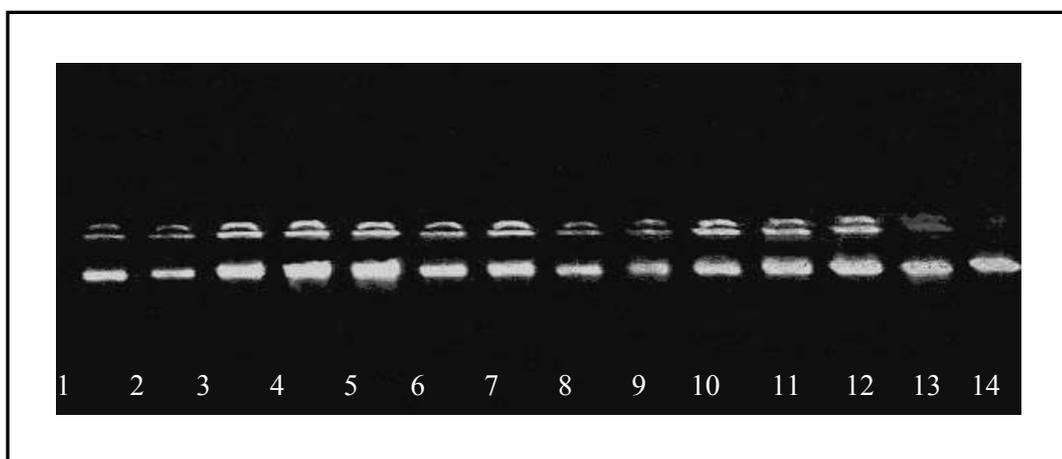


Figura 5. Gel representativo de DNAs de pacientes e controles. O gel possui amostras representativas de DNA extraídos de pacientes com PCM (1 a 7) e controles (8 a 14) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 μ l DNA + 9 μ l H₂O + 1,3 μ l tampão de amostra por poço).

5.2. Análise do produto de PCR amplificado pelo oligo 1

O produto de PCR amplificado pelo oligo 1 foi verificado através de corrida em gel de agarose 1% com marcador de massa molecular “100 bp Leader Invitrogen™”, para que o tamanho dos amplicons obtidos pudessem ser avaliados. As bandas mostradas no gel apresentam tamanho de aproximadamente 700 pares de base (bp), compatível com o tamanho esperado (731 bp) para os amplicons (**Figura 6**). Após a reação de amplificação pela PCR, estas amostras foram purificadas com o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)”. Após a purificação, tiveram suas concentrações estimadas em gel de agarose 1% com marcador de massa molecular, sendo então submetidas ao seqüenciamento automático.

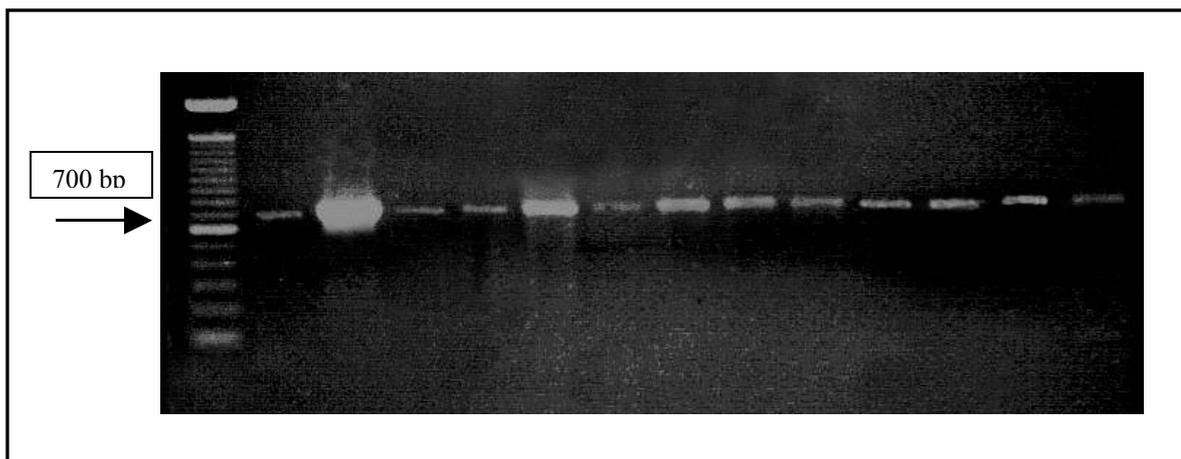


Figura 6. Gel representativo dos produtos de PCR com oligo 1. O gel mostra bandas representativas da reação de PCR com oligo 1 mostrando tamanho compatível com 731 bp (1 μ l de produto amplificado + 9 μ l H₂O + 1,3 μ l tampão de amostra por poço) em gel de agarose 1%. À esquerda, marcador de massa molecular com a seta preta indicando a banda referente a 700 bp.

5.3. Seqüenciamento das amostras amplificadas com o oligo 1

As amostras amplificadas com o oligo 1 foram seqüenciadas no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare) para que a determinação dos genótipos de cada amostra pertencente aos grupos de pacientes e controles pudesse ser realizada. A determinação das bases presentes nas localizações referentes aos SNPs -318C/T do sítio promotor e +49 A/G do éxon 1 do CTLA-4 foi realizada através da análise individual dos eletroferogramas gerados pelo seqüenciador. Pode-se verificar que a posição referente ao SNP -318C/T apresentava uma base C (citosina) representada por um pico de cor azul ou uma base T (timina) representada por um pico de cor vermelha. A posição referente ao SNP +49 A/G apresentava uma base A (adenina) representada por um pico de cor verde ou uma base G (guanina) representada por um pico de cor preta. A sobreposição de picos com cores diferentes (referentes a bases diferentes) numa mesma localização caracteriza um genótipo heterozigótico para o SNP em questão, enquanto que a presença de um único pico, de uma única cor, caracteriza um genótipo homozigótico. A **Figura 7** exemplifica um dos genótipos caracterizados nas amostras estudadas, onde a posição -318 apresenta um único pico referente à base citosina, caracterizando o genótipo CC enquanto que a posição +49 mostra a presença de dois picos de cores distintas, representando as bases guanina e adenina respectivamente, caracterizando o genótipo heterozigoto AG para esta amostra.

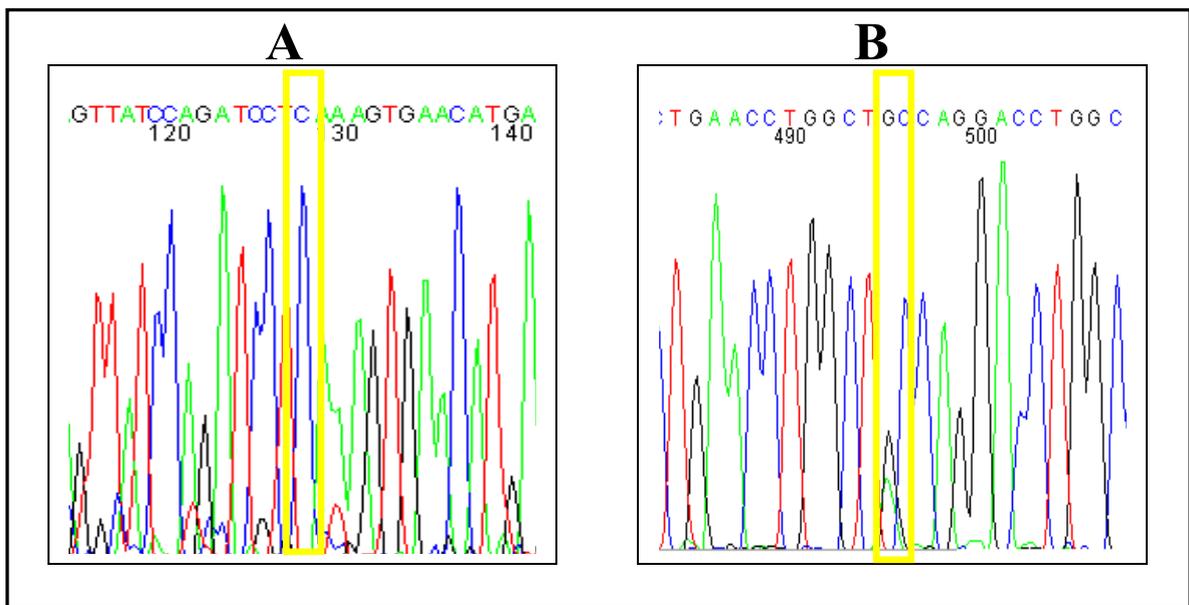


Figura 7. Representação dos eletroferogramas gerados pelo seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Em **A** o retângulo amarelo evidencia a posição correspondente ao SNP -318C/T e em **B** a posição correspondente ao SNP +49A/G para uma das amostras seqüenciadas. Observar que em **A** o pico de cor azul correspondente à citosina não possui sobreposição, e em **B** o pico de cor preta correspondente à guanina está sobreposto por um pico de cor verde correspondente à adenina, caracterizando o genótipo -318CC; +49AG para esta amostra.

5.4. Análise do SNP -318C/T

A distribuição dos genótipos CC, CT e TT em pacientes com PCM (n=74) e controles (n=76) relacionada à posição -318 está representada na **Tabela V**, assim como suas respectivas frequências obtidas e esperadas. A quantidade dos três genótipos mencionados em cada grupo de indivíduos foi determinada através da análise individual dos eletroferogramas. O genótipo CC é o mais freqüente para os dois grupos de amostras (88% em pacientes e 95% em indivíduos-controle) na posição -318 do gene CTLA-4, seguido do genótipo CT e ausência do genótipo TT. Observa-se que as frequências genótípicas não diferiram significativamente entre pacientes e controles, o que foi avaliado pelos testes de Qui-quadrado (valores significativos são considerados quando $P < 0,05$) e “*Odds Ratio*” [segundo Rumel, (1986) o limite inferior do intervalo de confiança atribuído ao “*Odds Ratio*” deve ser maior do que “1,0” para que se possa afirmar que em dado intervalo exista associação]. Pode-se observar também que as distribuições genótípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), pois as frequências obtidas para pacientes e controles não diferem significativamente das frequências esperadas, como verificado em “DeFinetti for Online HWE Analysis for SNP Data” (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>).

A partir da determinação dos genótipos foi possível verificar a distribuição dos alelos C e T e suas respectivas frequências nos dois grupos. Para isto, foi considerada a presença dos 2 alelos em cada indivíduo; sendo assim os valores de 2n considerados foram 148 e 152 para pacientes e controles, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram a maior frequência do alelo C (94% em pacientes e 97% em controles), enquanto que o alelo T apresentou uma frequência menor que 10% em ambos os grupos. De acordo com a análise estatística realizada, também não foram observadas diferenças significativas entre as frequências alélicas para os dois grupos estudados. A representação gráfica da distribuição dos genótipos e alelos para o SNP -318 do sítio promotor do CTLA-4 descrita na Tabela V para os grupos de pacientes e controles pode ser observada na **Figura 8**.

Tabela V. Distribuição dos **genótipos** e **alelos** com suas respectivas freqüências para a posição -318 do sítio promotor do CTLA-4 em pacientes com PCM e controles. N= número de indivíduos; fo= freqüência obtida; fe=freqüência esperada; *P*= *P* value; OR= Odds ratio; IC= Intervalo de Confiança.

Posição -318	Pacientes n = 74			Controles n = 76			<i>P</i>	OR	IC (95%)
	N	fo(%)	fe(%)	N	fo(%)	fe(%)			
Genótipos									
CC	65	88	(88,3)	72	95	(95,0)	0,13	0,40	[0,12 – 1,37]
CT	9	12	(11,3)	4	5	(4,9)	0,13	2,49	[0,73 – 8,48]
TT	0	0	(0,4)	0	0	(0,1)	-	-	-
HWE (<i>P</i>)	0,58			0,81					

Alelos	Pacientes (2n = 148)		Controles (2n = 152)		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	N	fo(%)	N	fo(%)			
C	139	94	148	97	0,142	0,42	[0,13 – 1,39]
T	9	6	4	3	0,142	2,40	[0,72 – 7,96]

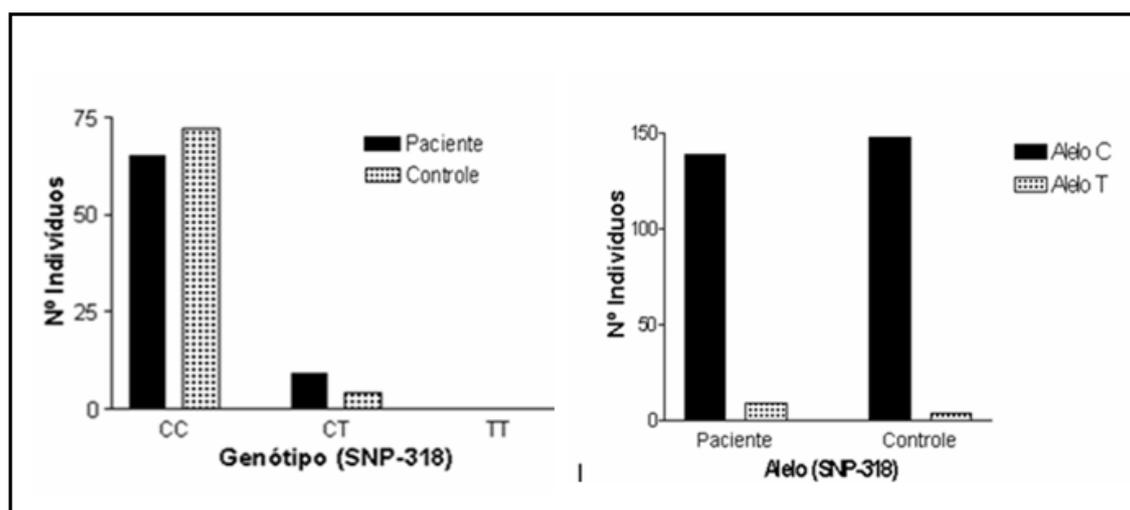


Figura 8. Representação gráfica da distribuição dos genótipos (CC, CT, TT) e alelos (C e T) para a posição -318 do sítio promotor do CTLA-4 nos os grupos de pacientes e controles.

5.5. Análise do SNP +49A/G

A distribuição dos genótipos AA, AG e GG de pacientes com PCM (n=74) e controles (n=76) para a posição do SNP +49 está representada na **Tabela VI**, assim como suas respectivas frequências obtidas e esperadas. A quantidade dos genótipos mencionados e suas respectivas frequências para cada grupo foram determinadas da mesma forma que para o SNP -318C/T. Os genótipos AA (pacientes = 39%; controles = 47%) e AG (pacientes = 49%; controles = 45%) são mais frequentes que o genótipo TT (pacientes = 12%; controles = 8%) em ambos os grupos para esta posição gene CTLA-4. Observa-se que as frequências genotípicas não diferiram significativamente entre pacientes e controles, o que foi avaliado pelos testes de Qui-quadrado e “*Odds Ratio*”. Pode-se observar também que as distribuições genotípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), pois as frequências obtidas para pacientes e controles não diferem significativamente das frequências esperadas, como verificado em “DeFinetti for Online HWE Analysis for SNP Data” (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>).

A partir da determinação dos genótipos foi possível verificar a distribuição dos alelos A e G e suas respectivas frequências nos grupos de pacientes e controles. Para isto, também foi considerada a presença dos 2 alelos em cada indivíduo. Os resultados obtidos mostraram a maior frequência do alelo A nos dois grupos (64% em pacientes e 70% em controles), enquanto que o alelo G apresentou uma frequência menor (36% em pacientes e 30% em controles). De acordo com a análise estatística realizada, também não foram observadas diferenças significativas entre as frequências alélicas para os dois grupos estudados. A representação gráfica da distribuição dos genótipos e alelos para o SNP +49 do éxon 1 do CTLA-4 descrita na Tabela VI para os grupos de pacientes e controles pode ser observada na **Figura 9**.

Tabela VI. Distribuição dos **genótipos** e **alelos** com suas respectivas freqüências para a posição -318 do sítio promotor do CTLA-4 em pacientes com PCM e controles. N= número de indivíduos; fo= freqüência obtida; fe=freqüência esperada; P= P value; OR= Odds ratio; IC= Intervalo de Confiança.

Posição +49	Pacientes n = 74			Controles n = 76			P	OR	IC (95%)
	N	fo(%)	fe(%)	N	f(%)	fe(%)			
Genótipos									
AA	29	39	(40,2)	36	47	(45,6)	0,31	0,72	[0,37 – 1,37]
AG	36	49	(46,7)	34	45	(45,1)	0,47	1,27	[0,66 – 2,43]
GG	9	12	(13,1)	6	8	(9,3)	0,38	1,62	[0,54 – 4,79]
HWE (P)	0,67			0,60					

Alelos	Pacientes (2n = 148)		Controles (2n = 152)		P	OR	IC (95%)
	N	fo(%)	N	fo(%)			
A	94	64	106	70	0,25	0,75	[0,47 – 1,22]
G	54	36	46	30	0,25	1,32	[0,82 – 2,14]

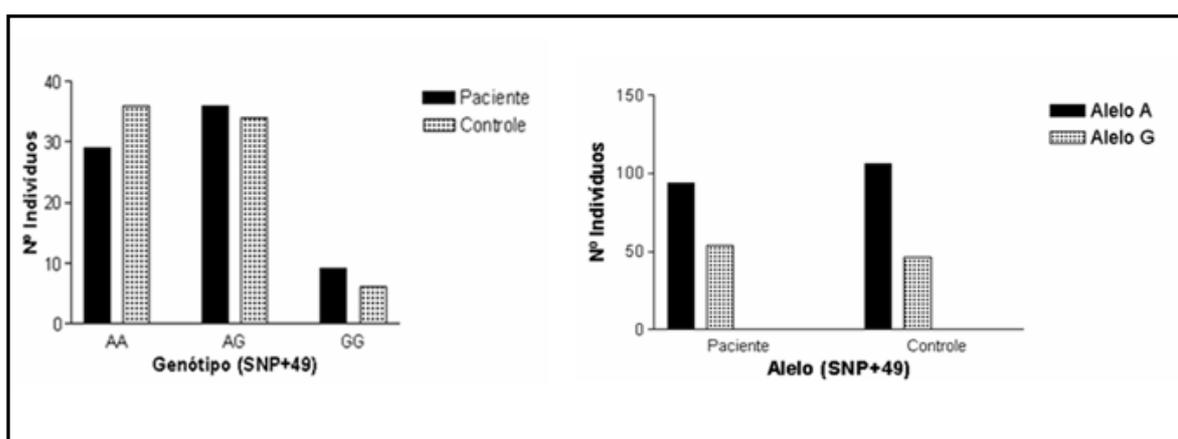


Figura 9. Representação gráfica da distribuição dos genótipos (AA, AG, GG) e alelos (A e G) para a posição +49 do éxon 1 do CTLA-4 nos grupos de pacientes e controles.

5.6. Associação haplotípica dos SNPs -318C/T e +49A/G

Esta análise foi realizada utilizando-se o programa “Haploview” (Barret *et al.*, 2005), com o qual foi possível estimar os haplótipos das amostras de pacientes e controles e suas respectivas frequências haplotípicas. Este software permite também visualizar padrões de desequilíbrio de ligação (LD) entre os dois SNPs. O resultado revelou a ocorrência de três tipos de haplótipos em ambos os grupos de amostras: CA, CG e TA. O haplótipo TG (também esperado) não foi observado, provavelmente pela baixa frequência do alelo T observada em ambos os grupos. A composição dos haplótipos é dada da seguinte forma: CA é formado a partir da herança do alelo C do SNP -318 com o alelo A do SNP +49; CG é formado a partir da herança do alelo C do SNP -318 com o alelo G do SNP +49; TA é formado a partir da herança do alelo T do SNP -318 com o alelo A do SNP +49.

As frequências haplotípicas observadas foram diferentes das frequências esperadas (0,25 para cada um dos quatro haplótipos esperados: CA, CG, TA, TG) - **Tabela VII**. Observou-se que o haplótipo CA ocorre com maior frequência nos dois grupos (57,4% em pacientes e 67,1% em controles), seguido pelo haplótipo CG (36,5% em pacientes e 30,3% em controles). O haplótipo TA mostrou frequência abaixo de 10% em ambos os grupos de análise.

Após a estimativa dos haplótipos, o software forneceu o desvio entre as frequências observadas e esperadas, o qual é representado por D' . Valores positivos de D' , diferentes de zero, indicam LD. Os dados desta análise mostram que existe um desequilíbrio de ligação entre os SNPs -318 e +49, com valor de $D'=1$ (Tabela VII). A análise estatística pelo teste de Qui-Quadrado verificou que não existem diferenças significativas entre os grupos de pacientes PCM e controles com relação às frequências haplotípicas.

A representação gráfica dos haplótipos CA, CG, TA e suas respectivas frequências descritas na Tabela VII para pacientes e controles está mostrada na **Figura 10**.

Tabela VII. Caracterização dos **haplótipos** e suas respectivas frequências (f) nos grupos de pacientes PCM e controles, fornecidas pelo programa “Haploview”. $P = p$ value.

Haplótipos	Pacientes (n = 74) f (%)	Controles (n = 76) f (%)	P
CA	57,4	67,1	0,08
CG	36,5	30,3	0,25
TA	6,1	2,6	0,14

Desvio entre as frequências observadas e esperadas (D') = 1.

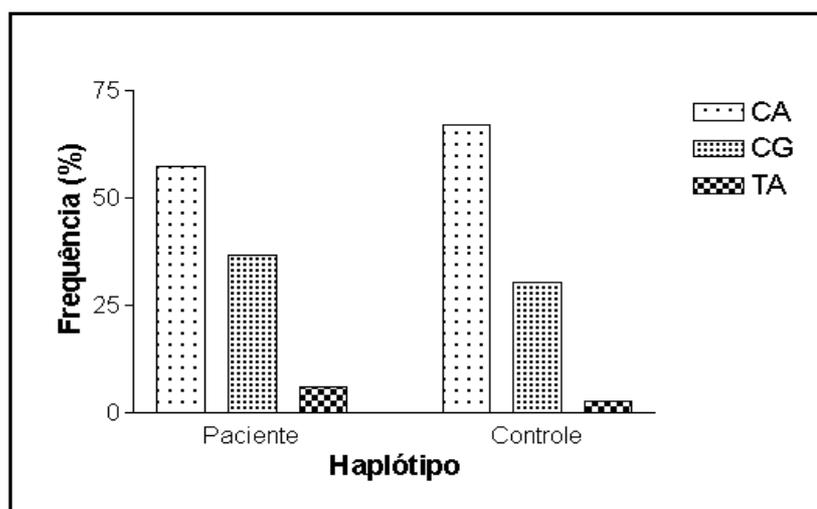


Figura 10. Representação gráfica das frequências haplotípicas observadas nos grupos de pacientes e controles através da análise obtida pelo programa “Haploview”. O haplótipo CA ocorre em maior frequência nos grupos descritos, seguido pelos haplótipos CG e TA respectivamente.

5.7. Análise da estrutura populacional

5.7.1 Reação de PCR e genotipagem

A análise da estrutura populacional foi realizada para verificar o grau de homogeneidade genética entre os dois grupos. A existência de uma não-homogeneidade entre os grupos comparados poderia acarretar a ocorrência de resultados espúrios no estudo de associação de polimorfismos no gene CTLA-4 com a PCM.

O sistema multiplex foi utilizado para a realização de uma tipagem rápida e eficiente dos marcadores informativos de ancestralidade (AIMs). Foram utilizados 16 AIMs, o que deveria gerar na reação de amplificação 16 bandas referentes aos amplicons destes marcadores, de tamanhos que variariam entre 100-300 pb. A análise dos fragmentos amplificados revelou a presença de bandas na região com os tamanhos esperados, que variaram entre 100 e 300 bp, como mostrado na **Figura 11**. O aparecimento de todas as bandas correspondentes a todos os marcadores utilizados não foi verificado, pois vários produzem amplicons de tamanhos semelhantes.

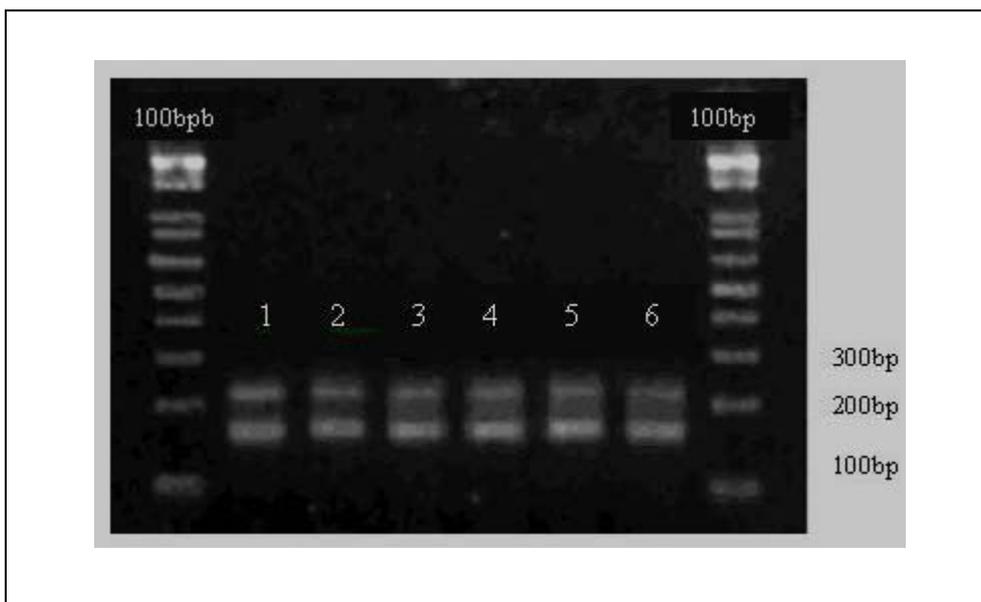


Figura 11. Gel de agarose 2% representativo das amostras controle 1 a 5 amplificadas com 16 marcadores de ancestralidade (AIMs) em sistema multiplex (3 μ l de amplicon + 7 μ l de H₂O + 1,3 μ l de tampão de amostra).

O material amplificado foi purificado para eliminação de excesso de dNTP e submetido à reação de minisequenciamento por SNaPshot™. Um eletroferograma representativo da genotipagem dos amplicons marcados, do total de 113 realizados (70 DNAs do grupo controle e 43 de pacientes), utilizando 16 marcadores informativos de ancestralidade

(AIMs), amplificados pelo método de minisequenciamento em sistema múltiplo, está mostrado na **Figura 12**.

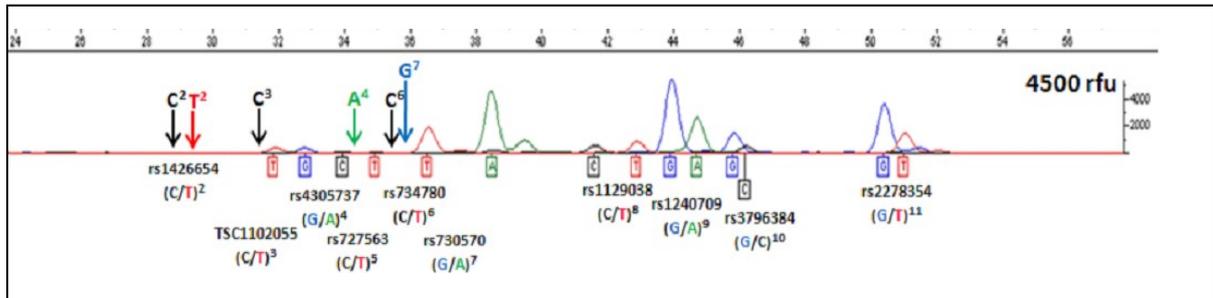


Figura 12. Eletroferograma representativo da amplificação dos alelos dos AIMs por SNaPshot™ para uma das amostras controle utilizadas no estudo. Os picos referentes às diferentes bases estão representados pelas cores: azul (G), verde (A), preto (C), vermelho (T). rfu = unidade relativa de fluorescência.

5.7.2. Caracterização da ancestralidade

Os dados obtidos a partir da genotipagem das amostras analisadas de pacientes com PCM (43) e controles (70) foram analisados junto aos dados dos genótipos de três populações parentais alocadas no HapMap: Africanos Sub-saarianos, Ameríndios e Euro-Americanos, caracterizando a proporção de indivíduos na amostragem em cada população pré-definida no programa “Structure 2.1” para os *clusters* europeu, ameríndio e africano (**Tabela VIII**). Os resultados mostram que ambos os grupos, pacientes com PCM e controles, possuem maior ancestralidade européia (superior a 70%), seguida das ancestralidades ameríndia e africana. As proporções de ancestralidade européia, ameríndia e africana encontradas mostram diferenças não-significativas entre pacientes e controles ($P = 0,221$), refletindo a homogeneidade genética entre os dois grupos.

Tabela VIII. Caracterização da média da proporção dos membros de cada população analisada para os *clusters* europeu (1), ameríndio (2) e africano (3).

População	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Nº indivíduos
*Africanos	0,017	0,026	0,957	120

Sub-saarianos				
*Ameríndios	0,023	0,950	0,027	69
*Euro-Americanos	0,961	0,028	0,011	78
<hr/>				
*Pacientes PCM	0,717	0,148	0,135	43
*Controles	0,767	0,104	0,129	70
<hr/>				
$P = 0,221$				

A representação gráfica das amostras de pacientes e controles de acordo com a ancestralidade atribuída a cada grupo (mostrado na tabela VIII) é observada na **Figura 13**.

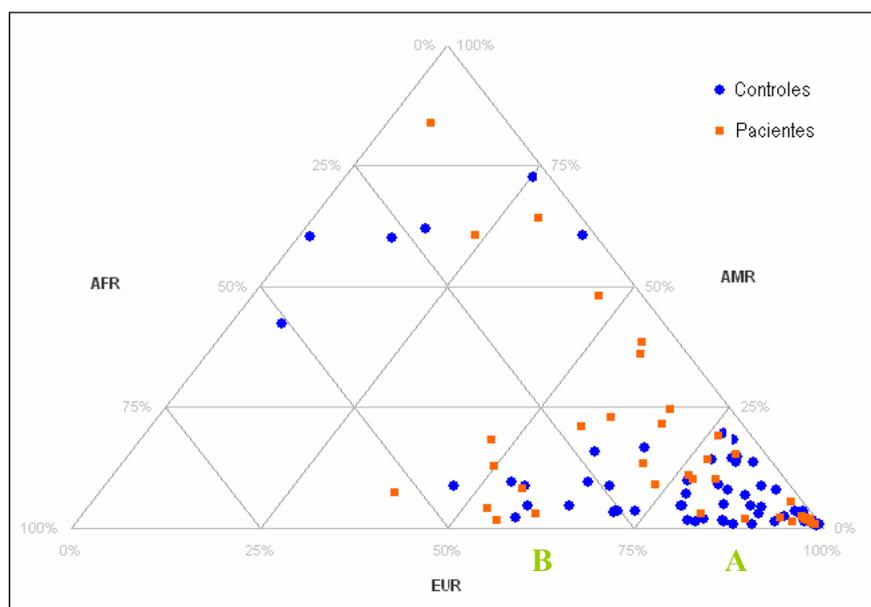


Figura 13. Gráfico tipo triângulo com os três vértices representando em cada um deles o valor de 100% de cada ancestralidade atribuída aos indivíduos dos dois grupos estudados (pacientes PCM e controle). Observa-se um maior predomínio de ancestralidade europeia em ambos os grupos, com semelhança em relação às suas distribuições entre as ancestralidades ameríndia e africana.

Os três vértices do triângulo indicam a caracterização máxima em cada ancestralidade, que vai diminuindo à medida que os pontos representativos das populações se afastam dos vértices. As linhas internas do triângulo facilitam a caracterização aproximada da ancestralidade para cada amostra. É possível observar que a maioria dos pacientes e controles encontra-se em uma área do triângulo (**A**) onde a ancestralidade europeia para estas amostras

varia entre 75% e 100% e a ancestralidade ameríndia varia entre 0% e 25%. Outro grupo de amostras encontra-se distribuídos em uma área (B) onde a ancestralidade europeia varia entre 50% e 75%, a ancestralidade ameríndia varia entre 25% e 50% e a ancestralidade africana varia entre 25% e 50%.

Também foi realizado no programa “Structure 2.1” o cálculo do valor de Fst, o qual mede a diferença entre uma população e outra baseado em dados de frequência alélica. Valores de Fst próximos a zero apontam para homogeneidade genética entre os grupos em questão. A média e o desvio-padrão dos grupos de pacientes com PCM e controles são apresentados na **Tabela IX**.

Tabela IX. Médias e respectivos desvios-padrão (SD) apresentados para os grupos de pacientes com PCM e controles com relação aos clusters Europeu (EU), Ameríndio (AM) e Africano (AF).

	<i>Clusters</i>				<i>Clusters</i>		
Controles	EU	AM	AF	Pacientes	EU	AM	AF
Média	0,767	0,104	0,129	Média	0,717	0,148	0,135
SD	0,237	0,164	0,137	SD	0,250	0,191	0,155
Máx	0,991	0,727	0,550	Máx	0,986	0,839	0,579
Mín	0,015	0,005	0,003	Mín	0,059	0,008	0,007

Fst = 0,002 P = 0,221

O resultado encontrado de Fst (0,002) confirma a observação de que os grupos analisados neste trabalho não apresentam níveis de heterogeneidade significativos, caracterizando a homogeneidade genética das amostras envolvidas neste estudo de associação. Esta caracterização evita a obtenção de resultados espúrios, que poderiam estar associados à ancestralidade das amostras caso as mesmas fossem geneticamente heterogêneas e não ao fenótipo estudado.

6. DISCUSSÃO

O CTLA-4 é expresso principalmente em células T ativadas e tem papel fundamental na resposta imune, exercendo efeito regulador na ativação de célula T através da sua ligação com as moléculas da família B7 expressas em células apresentadoras de antígenos. Estudos

experimentais mostram que camundongos nocauteados para o gene CTLA-4 desenvolvem distúrbios linfoproliferativos, o que confirma a importância do seu papel na manutenção da homeostase imunológica (Tivol *et al.*, 1995). A influência dos polimorfismos localizados na região promotora (SNP -318C/T) e no éxon 1 (SNP +49A/G) do CTLA-4 nas respostas imunes e susceptibilidade à doenças tem sido demonstrada em estudos de associação genética (Nistico *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002; Polychronakos, 2003; Zalloua *et al.*, 2004; Kavvoura & Ioannidis, 2005; Badenhoop & Seidl, 2003; Furugaki *et al.*, 2004; Yanagawa *et al.*, 2007).

Estudos recentes mostram a relação entre o polimorfismo na posição +49 do éxon 1 e a regulação negativa exercida sobre a ativação da célula T. Este polimorfismo afeta a função inibitória do CTLA-4, sendo que o alelo +49G está associado a uma menor expressão de CTLA-4, com conseqüente resposta proliferativa aumentada de célula T (Kouki *et al.*, 2000). Algumas doenças autoimunes foram associadas a este polimorfismo, como a artrite reumatóide (Han *et al.*, 2005), diabetes (Nistico *et al.*, 1996) e o hipotireoidismo autoimune (Zalatel *et al.*, 2006). Com relação ao SNP -318C/T, experimentos realizados em células T por Wang *et al.* (2002) mostraram que o mesmo estava associado a uma alta atividade promotora do gene CTLA-4, provocando uma maior expressão da proteína e regulando de forma acentuada a resposta de célula T, o que seria relevante na regulação das respostas autoimunes. Além da correlação do CTLA-4 com doenças autoimunes, alguns grupos estudaram o papel dessa molécula em doenças infecciosas. Martins *et al.* (2004) verificaram que o CTLA-4 é uma molécula importante no controle da resposta contra parasitos. A indução da sua expressão por agentes infecciosos (principalmente na fase aguda da doença, levando a uma forte imunossupressão) poderia ser parte de um mecanismo desenvolvido pelo parasito visando sua evasão da ação do sistema imune.

Na PCM verifica-se uma ampla variação da resposta imunológica, dependente principalmente do nível de supressão da imunidade celular. Lacaz *et al.* (1992) realizaram estudos correlacionando o quadro histológico da forma clínica crônica da doença com a resposta imune humoral e celular, definindo duas formas polares: o pólo positivo ou hiperérgico e o negativo ou anérgico. Entre essas duas formas polares existe um amplo espectro de manifestações com reatividade imunológica variável. Os indivíduos do pólo hiperérgico, com imunidade celular preservada e anticorpos específicos geralmente não demonstrados, apresentam lesões localizadas, poucos parasitos nas lesões e estado geral preservado. Por outro lado os indivíduos do pólo anérgico, com imunidade celular deprimida e altos níveis de anticorpos circulantes, apresentam lesões disseminadas ou sistêmicas, grande quantidade de fungos nas lesões e estado geral comprometido, o que reflete na severidade

com que a doença se desenvolve. Esta polarização das formas clínicas também é observada nos modelos experimentais e Calich *et al.* (1987) demonstraram que, no modelo murino, a resistência e susceptibilidade estão associadas a um gene autossômico dominante. Campanelli *et al.* (2003) e Cavassani *et al.* (2006) demonstraram que a hiporesponsividade imune celular presente na PCM, além de estar relacionada a alguns fatores como a secreção alterada de citocinas (TGF- β , IL-10, IFN- γ) e moléculas indutoras da apoptose de células T (Fas e Fas-L), também possui relação com o CTLA-4. Pacientes portadores de PCM apresentam maior expressão dessa proteína do que indivíduos controles. Além disso, a presença de células T expressando quantidades aumentadas de CTLA-4 no sangue e nas lesões de pacientes com a forma crônica de PCM sugere uma regulação da resposta imune sistêmica e local nessa doença. O bloqueio de CTLA-4 e de Fas-L por anticorpos específicos resulta em um aumento na produção de IFN- γ e significativa proliferação de células T (Campanelli *et al.*, 2003).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a associação entre os SNPs -318C/T e +49A/G do gene CTLA-4 e pacientes com PCM. Um total de 150 amostras de DNA foram utilizadas, sendo que destas, 76 eram amostras de indivíduos controles, e 74 eram amostras de pacientes com PCM, a maioria portadores da forma crônica, provenientes de três diferentes estados do País: Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Foram empregadas técnicas moleculares como a PCR e o seqüenciamento automático dos seus produtos, visando evidenciar os polimorfismos citados em cada amostra e determinar os genótipos das amostras analisadas. A comparação destes genótipos entre os grupos de pacientes e controles não revelou diferenças estatisticamente significativas para os dois SNPs analisados. Além da análise genotípica, realizou-se a análise comparativa entre os dois grupos da frequência dos alelos C, T, A e G para cada um dos SNPs citados. Novamente não foram observadas diferenças significativas entre as amostras de pacientes com PCM e controles. Esses resultados mostram que não existe relação entre qualquer dos alelos ou genótipos avaliados com a PCM. Os SNPs -318 e +49 apresentaram forte desequilíbrio de ligação ($D'=1$). O desequilíbrio de ligação representa a situação onde uma determinada combinação de alelos, chamada de haplótipo, encontra-se numa frequência estatisticamente diferente daquela esperada caso os alelos estivessem associados aleatoriamente e em equilíbrio (Lewontin, 1988). Tal fato nos levou a analisar a associação entre os haplótipos obtidos (CA, CG, TA) para os dois grupos de amostras estudados e a PCM. A comparação entre as frequências haplotípicas para os grupos de pacientes e controles foi realizada, e também mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, evidenciando que não existe relação entre qualquer dos haplótipos observados e a PCM.

Ainda existem poucos relatos na literatura correlacionando os polimorfismos existentes no gene CTLA-4 com doenças neoplásicas e infecciosas. Ghaderi *et al.* (2004) estudaram a correlação do SNP +49A/G com câncer de mama em 197 mulheres iranianas diagnosticadas com o câncer e 151 controles. Foi verificado que o genótipo +49 AA, considerado protetor para as doenças autoimunes, estava relacionado à progressão do câncer de mama, considerando-se que indivíduos que possuem o genótipo AA expressam mais CTLA-4, o que irá regular negativamente a resposta imune contra as células tumorais. Estudos realizados por Thio *et al.* (2004) sugeriram que o alelo +49G estava associado com a recuperação da infecção pelo vírus da hepatite B, de forma isolada ou associada com o alelo C no SNP-1722, alterando a regulação negativa normalmente exercida pelo CTLA-4 na resposta imune. Os grupos estudados neste trabalho foram compostos de 189 indivíduos portadores de hepatite B crônica e 338 indivíduos que apresentaram recuperação da infecção pelo vírus causador da hepatite B. A presença do alelo +49G foi detectada com maior frequência no grupo de indivíduos que apresentaram recuperação da infecção, mostrando que este alelo estava relacionado com o vigor da resposta imune apresentada nesses pacientes. Estes dados corroboram com o que foi descrito por Kouki *et al.* (2000), onde o alelo +49G está associado a uma diminuição da expressão do CTLA-4, resultando em uma resposta imune com maior intensidade. Recentemente, Su *et al.* (2007) estudaram a correlação do polimorfismo do CTLA-4 com o câncer em 144 mulheres tailandesas com carcinoma cervical escamoso e 378 mulheres tailandesas saudáveis. Foi verificada uma maior frequência do alelo -318T em mulheres portadoras do papiloma vírus humano do que em mulheres saudáveis, sugerindo o envolvimento deste SNP com a persistência do vírus, que é o principal agente causal do câncer de colo uterino. Esses resultados corroboram o que foi descrito por Wang *et al.* (2002), que mostraram a associação do alelo -318T com uma maior expressão da proteína, regulando negativamente a resposta imune. Adicionalmente, alguns trabalhos sugerem que exista uma forte ligação entre os SNPs -318 e o +49 do éxon 1 (Kristiansen *et al.*, 2000; Liegers *et al.*, 2001), sugerindo que os haplótipos decorrentes desses SNPs possam estar associados a algumas doenças onde não se encontra associação para tais SNPs isoladamente.

Estudos correlacionando o polimorfismo de genes de citocinas relevantes para a eficiência da resposta imunológica foram realizados por Bozzi *et al.* (2006), que avaliaram a frequência dos polimorfismos em duas citocinas presentes no soro de pacientes com PCM (n=54) e controles (n=31), a IL-10 (-1082 G/A) e o TNF- α (-308 G/A). Estes estudos indicaram que a frequência aumentada do genótipo GG para o SNP -1082 do gene da IL-10 (que auxilia no controle das respostas imunes inatas e adaptativas) em pacientes com PCM,

quando comparados com indivíduos controles, poderia ser considerada como um fator de risco para a susceptibilidade aumentada à PCM. Porém, essa correlação não foi observada para o TNF- α , bem como não se observou a correlação entre o polimorfismo e a produção dessas citocinas.

Apesar de existirem alguns estudos correlacionando a proteína CTLA-4 com a PCM (Campanelli *et al.*, 2003; Bozzi *et al.*, 2004; Cavassani *et al.*, 2006), o presente trabalho é pioneiro no que se refere à análise de associação entre polimorfismos do gene CTLA-4 com a PCM. O poder em estudos de associação é determinado pela inter-relação entre tamanho amostral, efeito do alelo no fenótipo em estudo, frequência do alelo na população e em casos onde o alelo estudado não é o alelo causal, a verificação do seu desequilíbrio de ligação com o verdadeiro alelo causal (Zondervan & Cardon, 2004). Os estudos de associação envolvendo polimorfismos do CTLA-4 em doenças autoimunes ou infecciosas possuem um número amostral médio de 231 indivíduos apresentando o fenótipo em estudo, variando de 133 até 483 indivíduos (Nistico *et al.*, 1996; Zalloua *et al.*, 2004; Thio *et al.*, 2004; Balbi *et al.*, 2007; Yanagawa *et al.*, 2007; Sue *et al.*, 2007). Em estudos com número amostral pequeno, a possibilidade de se encontrar associação, uma vez que ela exista, está basicamente relacionada ao alto efeito dos alelos, o que raramente ocorre em fenótipos não-mendelianos. Em nosso estudo não verificamos a existência de associação entre os SNPs -318 e +49 do CTLA-4 e a PCM com o número amostral utilizado (n=74 pacientes). Se o efeito dos alelos estudados fosse alto, a associação entre os polimorfismos e a PCM poderia ter sido detectada mesmo com este número amostral. É possível dizer que caso o número amostral deste trabalho fosse aumentado em cerca de três vezes, o que aproximaria do número médio de amostras utilizadas em outros trabalhos (n=231), se alguma associação fosse encontrada a mesma seria provavelmente fraca. Deve-se considerar a dificuldade de obtenção de amostras de indivíduos que apresentam a PCM, uma vez que não é uma doença de notificação compulsória.

Outro ponto importante a ser considerado neste trabalho é o estudo da estrutura genética (ancestralidade) dos grupos de pacientes e controles, pois diferenças em frequências alélicas têm sido observadas em grupos étnicos distintos (Guzman *et al.*, 2005). Quando pacientes e controles têm diferentes frequências alélicas atribuídas ao *background* genético, significando que o estudo apresenta uma estratificação populacional, isto se torna uma das razões mais comumente citadas para obtenção de resultados de associações genéticas espúrias (Tsuchiya *et al.*, 2002). Desta forma, nos estudos de associação, e principalmente naqueles onde a população brasileira (que é altamente miscigenada) constitui as amostras envolvidas no estudo, deve-se considerar a análise de ancestralidade para eliminar-se a possibilidade da

associação não ser uma consequência do *background* genético da amostragem, mas sim de fato do polimorfismo do gene-candidato escolhido para análise (Parra *et al.*, 2003). Através da utilização de dados alocados no Consórcio Internacional de Mapas de Haplótipos (HapMap) sobre as populações parentais de Europeus, Ameríndios e Africanos-Subsaarianos e de Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs), foi possível determinar a ancestralidade das amostras de pacientes com PCM e controles com auxílio da técnica de miniseqüenciamento. A grande vantagem desta técnica é a possibilidade de ser trabalhada em um sistema múltiplo, onde diferentes sítios de mutações podem ser investigados simultaneamente (Syvanen *et al.*, 1999). Verificou-se que há predomínio de ancestralidade européia em ambos os grupos de pacientes e controles (valores superiores a 70%) sobre as ancestralidades ameríndia e africana. Através desses resultados foi possível determinar que a população utilizada no estudo é geneticamente homogênea, e que o resultado negativo da associação detectado para o gene CTLA-4 e a PCM não está então possivelmente relacionado a ancestralidade da amostragem.

Os valores das freqüências genóticas e alélicas encontradas neste trabalho são similares aos verificados por Guzman *et al.*, (2005). Estes autores determinaram a freqüência de polimorfismos dos genes CD28, ICOS e CTLA-4 (SNPs -318 e +49) em três diferentes grupos étnicos da população brasileira (brancos, mulatos e negros), utilizando 279 indivíduos brasileiros saudáveis, provenientes da região sudoeste do país. Os resultados das freqüências genóticas e alélicas apresentados para o grupo étnico dos brancos (com ancestralidade predominantemente européia) é compatível com aqueles aqui encontrados para os grupos de pacientes e controles (que também possuem ancestralidade predominantemente européia), reforçando os resultados deste trabalho.

Diferentemente do que foi observado em estudos de associação envolvendo polimorfismos no gene CTLA-4 e doenças como a artrite reumatóide, diabetes, tireoidismo autoimune, hepatite B crônica e o carcinoma de colo uterino, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de pacientes com PCM e controles para os SNPs -318 e +49. Tal fato é provavelmente decorrente de: **1)** diferenças não-significativas das freqüências genóticas e alélicas entre os grupos de pacientes e controles; **2)** diferenças não-significativas entre as freqüências haplotípicas encontradas para os dois grupos; **3)** nível do efeito dos alelos estudados na PCM. Outros SNPs do gene CTLA-4 poderiam também ser investigados quanto a sua associação com a PCM. O marcador microsatélite (AT)_n, localizado na região 3'-UTR, tem sido relacionado em vários trabalhos de associação entre o CTLA-4 e doenças autoimunes, o que gera a curiosidade sobre sua possível influência em doenças infecciosas.

Além disso, não se pode descartar a possibilidade de que o aumento da expressão do CTLA-4 em pacientes com PCM não seja devido ao polimorfismo no seu gene, mas sim decorrente de outros pontos que controlem a sua expressão como possíveis alterações em fatores de transcrição decorrentes do contato com o fungo *P. brasiliensis*. O aumento da expressão de CTLA-4 também poderia ocorrer como um mecanismo compensatório caso outras vias envolvidas na regulação da resposta imune celular estivessem prejudicadas.

Em resumo, este trabalho demonstra que, considerando a amostragem analisada, não foi detectada nenhuma correlação/associação entre o polimorfismo dos SNPs -318 e +49 do gene CTLA-4 e a resistência e/ou susceptibilidade à paracoccidiodomicose. Em decorrência da complexidade do processo inflamatório desenvolvido no curso da PCM, não se pode excluir a possibilidade de associação entre polimorfismos em outros genes relacionados com a resposta imune e a PCM. As citocinas produzidas no curso desta infecção determinam diretamente as populações celulares que migram para o foco inflamatório assim como o grau de ativação destas células recém-migradas. Em adição, a expressão do gene CTLA-4 está relacionada a um mecanismo regulatório que ocorre na fase mais tardia da resposta imune sendo que esta expressão também é influenciada pelas citocinas produzidas no foco inflamatório. Considerando a importância dos diferentes mediadores produzidos no curso da PCM é importante investigar o polimorfismo em outros genes que estão envolvidos com a transdução de sinal nas células que interagem com o fungo, bem como outras citocinas/proteínas importantes na ativação/regulação da resposta do hospedeiro.

7. CONCLUSÃO

Considerando que:

- a comparação das frequências genótípicas e alélicas, entre os grupos pacientes e controles, não mostrou diferenças significativas que pudessem associar o polimorfismo dos SNPs -318 e +49 do gene CTLA-4 com a PCM;

- apesar de ter sido detectado um desequilíbrio de ligação entre os SNPs -318 e +49 do gene CTLA-4, a comparação dos haplótipos não mostrou diferenças significativas entre os grupos;
- o estudo de ancestralidade das amostras envolvidas no estudo mostrou homogeneidade genética entre os grupos, o que reforçou a não existência de associação dos polimorfismos estudados do gene CTLA-4 e a PCM;

Pode-se concluir que os dados deste trabalho indicam que os SNPs -318 e +49 do gene CTLA-4 não estão associados à resistência e ou susceptibilidade à PCM.

8. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos até o momento, pode-se colocar como perspectivas analisar a possível associação do marcador microsatélite (AT)_n da região 3'-UTR do gene CTLA-4 com a PCM bem como a possibilidade de analisar o polimorfismo de outros genes envolvidos na resposta imune (por exemplo, o CD28).

9. REFERÊNCIAS

Abbas A. K., Lichtman A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier Editora Ltda., 8:179-195, 2005.

Akamizu T., Sale M. M., Rich S. S., Hiratani H., Noh J. Y., Kanamoto N., Saijo M., Miyamoto Y., Saito Y., Nakao K., Bowden D. W. Association of autoimmune thyroid disease

with microsatellite markers for the thyrotropin receptor gene and CTLA-4 in Japanese patients. *Thyroid*, 10:851-858, 2000.

Altshuler D., Brooks L.D. et al. A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437:1299-1320, 2005.

Andreotti P. F., Monteiro da Silva J. L., Bailão A. M., Soares C. M., Bernard G., Soares C. P., et al. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection*, 7:875-881, 2005.

Anjos S., Nguyen A., Benkalha H. O., Tessier M. C., Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic t-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(48):46478-46486, 2002.

Anjos S., Polychronakos C. Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81:187-195, 2004.

Arancibia S. A., Beltran C. J., Aguirre I. M. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biological Research*, 40(2):97-112, 2007.

Aristizabal, B. H., V. C. Karl, A. S. David, A. Restrepo. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infection and Immunity*, 66: 5587-5591, 1998.

Badenhoop K., Seidl C. Fine-tuning of T lymphocytes in autoimmunity: genetic association of CTLA-4 variants and Graves' disease revisited. *Clinical Endocrinology*, 59:555-557, 2003.

Bagos P. G., Karnaouri A. C., Nikolopoulos G. K., Hamdrakas S. J. No evidence for association of CTLA-4 gene polymorphisms with the risk of developing multiple sclerosis: a meta-analysis. *Multiple Sclerosis*, 13:156-168, 2007.

Balzano C., Buonavista N., Rouvier E., Golstein P. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *International Journal of Cancer*, supplement 7:28-32, 1992.

Barbosa M. S., Bao S. N., Andreotti P. F., De Faria F. P., Felipe M. S. S., Feitosa L. S., Mendes-Giannini M. J., Soares C. M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infection and Immunity*, 74:382-389, 2006.

Barreto M., Santos E., Ferreira R., Fesel C., Fontes M. F., Pereira C., Martins B., Andréia R., Viana J. F., Crespo F., Vasconcelos C., Ferreira c., Vicente A. M. Evidence for CTLA-4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *European Journal of Human Genetics*, 12:620-626, 2004.

Barret J. C., Fly B., Maller J., Daly M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2):263-265, 2005.

- Bernard G., Romano C. C., Cacere C. R., Juvenale M., Mendes-Gianinni M. J., Duarte A. J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, 13:248-252, 2001.
- Blomhoff A., Lie B. A., Myhre A. G., Kemp E. H., Weetman A. P., Akselsen H. E., Huseby E. S., Undlien D. E. Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility to Addison's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(7):3474-3476, 2004.
- Bocca A. L., Hayashi E. E., Pinheiro A. G., Furlanetto A. B., Campanelli A. P., Cunha F. Q., Figueiredo F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *The Journal of Immunology*, 161:3056-3063, 1998.
- Bozzi A., Reis B. S., Prado F. L. S., Pedroso E. P., Leite M. F., Goes A. M. Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60:500-505, 2004.
- Bozzi A., Pereira P. P. N., Reis B. S., Goulart M. I., Pereira M. C. N., Pedroso E. P., Leite M. F., Goes A. M. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. *Human Immunology*, 67:931-939, 2006.
- Brummer E., Castaneda E., Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Reviews*, 89-117, 1993.
- Butty V., Roy M., Sabeti P., Bessi W., Benoist C., Mathis D. Signatures of strong population differentiation shape extended haplotypes across the human CD28, CTLA-4, and ICOS costimulatory genes. *PNAS*, 104(2):570-575, 2007.
- Calich V. L., Singer-Vermes L. M., Siqueira A. M., Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *British Journal of Experimental Pathology*, 66:585-594, 1985.
- Calich V. L., Burger E., Kashino S. S., Fazioli R. A., Singer-Vermes L. M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. *Infection and Immunity*, 55:1919-1923, 1987.
- Camargo Z. P., Franco M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 17:41-48, 2000.
- Campanelli A. P., Martins G. A., Souto J. T., Pereira M. S. F., Livonesi M. C., Martinez R., Silva J. S. Fas-Fas Ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with Paracoccidioidomycosis. *The Journal of Infectious Disease*, 187:1496-1505, 2003.
- Cardon L. R., Palmer L. J. Population stratification and spurious allelic association. *The Lancet*, 361: 598-604, 2003.

Cavassani K. A., Campanelli A. P., Moreira A. P., Vancim J. O., Vitali L. H., Mamede R. C., Martinez R., Silva J. S. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *The Journal of Immunology*, 177:5811-5818, 2006.

Chan J., Flynn J. L. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clinical Immunology*, 110:2-12, 2004.

Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature*, 4:336-347, 2004.

Cheng T. Y., Lin J. T., Chen L. T., Shun C. T., Wang H. P., Lin M. T., Wang T. E., Cheng A. L., Wu M. S. Association of T-cell regulatory gene polymorphisms with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24(21): 3483-3489, 2006.

Chistiakov D. A., Turakulov R. I. CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, 31:21-36, 2003.

Cipriano C., Caruso C., Lio D., Giacconi R., Malavolta M., Muti E., Gasparini N., Franceschi C., Mocchegiani E. The -308G/A polymorphism of TNF-alpha influences immunological parameters in old subjects affected by infectious diseases. *International Journal of Immunogenetics*, 32:13, 2005.

Coltri K. C., Casabona-Fortunato A. S., Gennari-Cardoso M. L., Pinzan C. F., Ruas L. P., Mariano V. S., et al. Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from *Paracoccidioides brasiliensis*, binds to laminin and induces TNF-alpha production by macrophages. *Microbes and Infection*, 8: 704-713, 2006.

Coutinho Z. F., Silva D., Lazera M., Petri V., Oliveira R. M., Sabroza P. C., Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Caderno de Saúde Pública*, 18:1441-1454, 2002.

Cutler J. E., Deepe G. S., Klein B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nature reviews Microbiology*, 5:13-28, 2007.

Dariavach P., Mattei M. G., Golstein P., Leranc m. P. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *European Journal of Immunology*, 18:1901-1905, 1988.

De Brito T., Franco M. F. Granulomatous inflammation. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 36:185-192, 1994.

Deichmann K., Heinzmann A., Bruggenolte E., Forster J., Kuchr J. An Mse I RFLP in the human CTLA-4 promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225:817-818, 1996.

Delves P. J., Roitt I. M. The Immune System. *The New England Journal of Medicine*, 343(2): 108-117, 2000.

Djilali-Saiah I., Schmitz J., Harfouch-Hammoud E., Mougenot J. F., Bach J. F., Caillat-Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to celiac disease. *Gut*, 43:187-189, 1998.

Dommer J. E., Murphy W., Deepe G. S., Franco M. Immunomodulation in the mycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 30(1):157-166, 1992.

Egen J. G., Kuhns M. S., Allison J. P. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nature Immunology*, 3(7):611-618, 2002.

Franco M., Peracoli M. T., Soares A., Montenegro R., Mendes R. P., Meira D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Current Topics in Medical Mycology*, 5:115-149, 1993.

Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 25:5-15, 1987.

Furugaki K., Shirasawa S., Ishikawa N., Ito K., Koichi I., Kubota S., Kuma K., Tamai H., Akamisu T., Hiratani H., Tanaka M., Sasazuki T. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with Graves' disease and autoimmune thyroid disease in the Japanese. *Journal of Human Genetics*, 49:166-168, 2004.

Gesztesi J. L., Puccia R., Travassos L. R., Vicentini A. P., deMoraes J. Z., Franco M. F., Lopes J. D. Monoclonal antibodies against the 43.000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma*, 15: 415-422, 1996.

Ghaderi A., Yeganeh F., Kalantari T., Talei A. R., Pezeshki A. M., Doroudchi M., Dehaghani A. S. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 86:1-7, 2004.

Gough S. C. L., Walker L. S. K., Sansom D. M. CTLA-4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunological Reviews*, 204:102-115, 2005.

Greenwald R. J., Boussiotis V. A., Lorschach R. B., Abbas A. K., Shape A. H. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*, 14:145-155, 2001.

Greenwald R. J., Freeman G. J., Sharpe A. H. The B7 family revisited. *Annual Reviews of Immunology*, 23:515-548, 2005.

Grosso D. M., Almeida S. R., Mariano M., Lopes J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 71:6534-6542, 2003.

Guzman V. B., Morgun A., Shulzhenko N., Mine K. L., Gonçalves-Primo A., Musatti C. C. Characterization of CD28, CTLA-4, and ICOS polymorphisms in three Brazilian ethnic groups. *Human Immunology*, 66:773-776, 2005.

Han S., Li Y., Mao Y., Xie Y. Meta-analyses of the association of CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism with rheumatoid arthritis. *Human Genetics*, 118:123-132, 2005.

Harbo H. F., Celius E. G., Vartdal F., Spurkland A. CTLA-4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. *Tissue Antigens*, 53:106-110, 1999.

Harper K., Balzano C., Rouvier E., Mattéi M. G., Luciani M. F., Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *The Journal of Immunology*, 147:1037-1044, 1991.

Hartgers F. C., Figdor C. G., Adema G. J. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunology Today*, 21(11):542-545, 2000.

Hartl D. L., Clark A. G. *Principles of population genetics*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1997.

Hoggart C. J., Parra E. J. et al: Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *American Journal of Human Genetics*, 72(6):1492-1504, 2003.

Holopainen P., Nalvai A. T., Moodie S., Percopo S., Coto I., Clot F., Ascher H., Sollid L., Ciclitira P., Greco L., Clerget-Darpoux F., Partanem J. Candidate gene region 2q33 in European families with coeliac disease. *Tissue Antigens*, 63:212-222, 2004.

Huang D., Giscombe R., Zhou Y., Pirskanen R., Lefvert A. K. Dinucleotide repeat expansion in the CTLA-4 gene leads to T cell hyper-reactivity via the CD28 pathway in myasthenia gravis. *Journal of Neuroimmunology*, 105:69-77, 2000.

Huffnagle G. B., Deepe G. S. Innate and adaptative determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 6:344-350, 2003.

Jago C. B., Yates J., Câmara N. O. S., Lechler R. I., Lombardi G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clinical and Experimental Immunology*, 136:463-471, 2004.

Janeway Jr. C. A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Reviews of Immunology*, 20:197-216, 2002.

Jankovic D., Liu Z., Gause W. C. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends in Immunology*, 22:450-457, 2001.

Katsikis P. D., Cohen S. B., Londei M., Feldman M. Are CD4+ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *International Immunology*, 7:1287-1294, 1995.

Kavvoura F. K., Ioannidis J. P. A. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a huge review and meta-analyses. *American Journal of Epidemiology*, 162:3-16, 2005.

Kerr J. B., Schaeffer G. V., Miranda D. S. Sex hormones and susceptibility of the rat to paracoccidiodomycosis. *Mycopathology*, 88:149-154, 1984.

Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review*, 8:223-246, 2003.

King A. L., Moodie S. J., Fraser J. S., Curtis D., Reid E., Dearlove A. M., Ciclitira P. J. Coeliac disease: investigation of proposed causal variants in the CTLA-4 gene region. *European Journal of Immunogenetics*, 30:427-432, 2003.

Kouki T., Sawai Y., Gardine C. A., Fisfalen M. E., Alegre M. L., DeGroot L. J. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Grave's disease. *Journal of Immunology*, 165:6606-6611, 2000.

Kouki T., Gardine C. A., Yanagawa T., DeGroot L. J. Relation of three polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients with Grave's disease. *Journal of Endocrinological Investigation*, 25:208-213, 2002.

Kristiansen O. P., Larsen Z. M., Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes and Immunity*, 1:170-184, 2000.

Kwok P. Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual Review of Genomics Human Genetis*, 2:235-258, 2001.

Lee K. M., Chuang E., Griffin M., Khattri R., Hong D. K., Zhang W., Straus D., Samelson L. E., Thompson C. B., Bluestone J. A. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science*, 282(5397):2263-2266, 1998.

Letterio J. J., Roberts A. B. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annual Review of Immunol.*, 16:137-161, 1998.

Levitz S. M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes and Infection*, 6:1351-1355, 2004.

Lewontin R. C. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, 120(3):849-852, 1988.

Ligers A., Teleshova N., Masterman T., Huang W-X., Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes and Immunity*, 2:145-152, 2001.

Ling V., Wu P. W., Finnerty H. F., Sharpe A. H., Gray G. S., Collins M. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA-4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics*, 60:341-355, 1999.

Ling V., Wu P. W., Finnerty H. F., Agostino M. J., Graham J. R., Chen S., Jussif J. M., Fisk G. J., Miller C. P., Collins M. Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA-4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. *Genomics*, 78:155-168, 2001.

Lins T. C. D. L. Impacto da miscigenação na aplicação do HapMap para a população brasileira, avaliada nos genes PTPN22 e VDR. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasil, 2007.

Lio D., Marino V., Serauto A., Gioia V., Scolla L., Crivello A., et al: Genotype frequencies of +874G/A single nucleotide polymorphism in the first intron of interferon- γ gene in a sample of Sicilian patients affected by infectious diseases. *European Journal of Immunogenetics*, 29:371, 2002.

Luszczek W., Kubicka W., Jasek M., Baran E., Cisto m., Nockowski P., Luczywo-Rudy M., Wisniewski A., Nowak I., Kusnierczyk P. CTLA-4 gene polymorphisms and natural soluble CTLA-4 protein in psoriasis vulgaris. *International Journal of Immunogenetics*, 33:217-224, 2006.

Mamoni R. L., Nouer S. A., Oliveira S. J., Musatti C. C., Rossi C. L., Camargo Z. P., Blotta M. H. S. L. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, 40:153-159, 2002.

Mamoni R. L., Blotta M. H. S. L. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, 35:207-216, 2006.

Mao Y., Brigham D., Chen D. Overexpression of a mutant CTLA-4 inhibits T-cell activation and homeostasis-driven expansion. *Experimental Hematology*, 32:735-747, 2004.

Martins G. A., Takodoro C. E., Silva R. B., Silva J. S., Rizzo L. V. CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, 172:4893-4901, 2004.

Masteller E. L., Chuang E., Mullen A. C., Reiner S. L., Thompson C. B. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *The Journal of Immunology*, 164:5319-5327, 2000.

Mäurer M., Loserth S., Kolb-Maurer A., Ponath A., Wiese S., Kruse N., Rieckmann P. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics*, 54:1-8, 2002.

McCoy K., Camberis M., Le Gros G. Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *The Journal of Experimental Medicine*, 186:183-187, 1997.

Medzhitov R., Janeway Jr. C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91:295-298, 1997.

Moretta A., Bottino C. Regulated equilibrium between opposite signals: a general paradigm of T cell function? *European Journal of Immunology*, 34:2084-2088, 2004.

Murphy K. M. T lymphocyte differentiation in the periphery. *Current Opinion in Immunology*, 10:226-232, 1998.

Murphy M. L., Cotterell S. E., Gorak P. M., Engwerda C. R., Kaye P. M. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Immunology*, 161:4153-4160, 1998.

Newman S. L., Bucher J., Rhodes W. E. B. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. *Cellular*

cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *The Journal of Clinical Investigation*, 85:223-230, 1990.

Nitisco L., Buzzetti R., Pritchard L. E., Van der Auwera B., Giovannini C., Bosi E., Larrad M. T. M., Rios M. S., Chow C. C., Cockram C. S., Jacobs K., Mijovic C., Bain S. C., Barnett A. H., Vandewalle C. L., Schuit F., Gorus F. K., Belgian Diabetes Registry, Tosi R., Pozzilli P., Todd J. A. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Human Molecular Genetics*, 5(7):1075-1080, 1996.

Parjis L. V., Abbas A. K. Homeostasis and self tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*, 280:243-248, 1998.

Parra F. C., Amado R. C., et al: Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 100(1):177-182, 2003.

Pasare C., Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptative immunity. *Microbes and Infection*, 6:1382-1387, 2004.

Pffaf C. L., Barnholtz-Sloan J. et al: Information on ancestry from genetic markers. *Genetic Epidemiology*, 26(4)305-315, 2004.

Polymeropoulos M. H., Xiao H., Rath D. S., Merrill C. R. Dinucleotide repeat polymorphism at the human CTLA-4 gene. *Nucleic Acid Researchs*, 19:4018, 1991.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*, 23:323-334, 1985.

Restrepo A., Salazar M. E., Cano L. E., Stover E P., Feldman D., Stevens D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. *Infection and Immunity*, 46:346-353, 1984.

Riley J. L., Blair P. J., Musser J. T., Abe R., Tezuka K., Tsuji T., June C. H. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *Journal of Immunology*, 166:4943-4948, 2001.

Romani L. The T cell response against fungal infections. *Current Opinion in Immunology*, 279:53-72, 1997.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 4:1-13, 2004.

Rosenberg, N. A. Genetic structure of human populations. *Science*, 298:2381, 2002.

Rosenberg N. A.; Li L. M., Ward R., Pritchard J. K. Informativeness of genetic markers for inference of ancestry. *American Journal of Human Genetics*, 73(6):1402-1422, 2003.

Rumel D. "Odds Ratio": Algumas Considerações. *Revista Saúde Pública*. São Paulo, 20:253-258, 1986.

Salazar M. E., Restrepo A., Stevens D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infection and Immunity*, 56:711-713, 1988.

Sambrook J., Russel D. W. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 3^o ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 1, cap. 6, 2001.

Sano A., Miyatji M., Nishimura K. Studies in the relationship between the estrous cycle of Balb/c mice and their resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathology*, 119:141-145, 1992.

Sayegh M. H. Finally, CTLA-4Ig graduates to the clinic. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(9):1223-1225, 1999.

Schaffner A., Davis C.E., Schaffner T., Market M., Douglas H., Braude A. I. *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophilgranulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *Journal of Clinical Investigation*, 78:511-524, 1986.

Shao W., Lazaryan A., Dorak M. T., Penman-Aguilar A., Wilson C. M., Margolick J. B., Goedert J. J., Prins M., Tang J., Kaslow R. A. Cohort- and time-specific associations of CTLA-4 genotypes with HIV-1 disease progression. *AIDS*, 20:1583-1590, 2006.

Shikanai-Yasuda M. A., Telles Filho F. Q., Mendes R. P., Colombo A. L., Moretti M. L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39:297-310, 2006.

Shiratori T., Miyatake S., Ohno H., Nakaseko C., Isono K., Bonifacino J. S., Saito T. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity*, 6:583-589, 1997.

Shriver M. D., Smith M. W., et al: Ethnic-affiliation estimation by use of population specific DNA markers. *The American Journal of Human Genetics*, 60(4):957-964, 1997.

Silva S. S., Tavares A. H. F. P., Silva D. G. P., Fachin A. L., Teixeira S. M. R., Soares C. M. A., Carvalho M. J. A., Bocca A. L., Pereira I. S., Passos G. A., Felipe M. S S. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Microbes and Infection* (in press) 2007.

Sowsan F. A., Chloe L. T., Divanovic S., Trompette A., Belkaid Y., Thomas D. L., Karp C. L. Association of CTLA4 polymorphism with regulatory t cell frequency. *The European Journal of Immunology*, 7:2157-2162, 2005.

Su T. H., Chang T. Y., Lee Y. J., Chen C. K., Liu H. F., Chu C. C., Lin M., Wang P. T., Huang W. C., Chen T. C., Yang Y. C. CTLA-4 gene and susceptibility to human papillomavirus16-associated cervical squamous cell carcinoma in Taiwanese women. *Carcinogenesis*, 28(6):1237-1240, 2007.

Syvanen A. C. From gels to chips: “minisequencing” primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation*, 13(1):1-10, 1999.

Tavares A. H. F. P. Perfil transcricional de *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta à fagocitose por macrófagos murinos. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil, 2007.

Thio C. L., Mosbruger T. L., Kaslow R. A., Karp C. L., Strathdee S. A., Vlahof D., O'Brien S. J., Astemborski J., Thomas D. L. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. *Journal of Virology*, 78(20):11258-11262, 2004.

Tivol E. A., Borriello F., Schweitzer A. N., Lynch W. P., Bluestone J. A., Sharpe A. H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3:541-547, 1995.

Tomer Y., Greenberg D. A., Barbesino G., Concepcion E., Davies T. F. CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(4):1687-1693, 2001.

Tsuchiya N., Ohashi J., Tokunaga K. Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders. *Immunological Reviews*, 190:169-181, 2002.

Ueda H., Howson J. M. M., Esposito L., Heward J., Snook H., Chmberlain G., Rainbow D. B., Hunter K. M. D., Smith A. N., Di Genova G., Herr M. H., Dahlman I., Payne F., Smyth D., Lowe C., Twells R. C. J., Howlett S., Healy B., Nutland S., Rance H. E., Everett V., Smink L. J., Lam A. C., Cordell H. J., Walker N. M., Bordin C., Hulme J., Motzo C., Cucca F., Hess J. F., Metzker M L., Rogers J., Gregory S., Allahabadla A., Nithlyananthan R., Wolf, E. T., Tuomillehto J., Bingley P., Gillespie K. M., Undllen D. E., Renningen K. S., Guja C., Tirgoviste C. I., Savage, D. A., Maxwell A. P., Carson D. J., Patterson C. C., Franklyn J. A., Clayton D. G., Petron L. B., Wicker L. S., Todd J. A., Gough S. L. C. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423:506-511, 2003.

van Belzen M. J., Mulder C. J. J., Zhernakova A., Pearson P. L., Houwen H. J., Wijmenga C. CTLA4 +49 A/G and CT60 polymorphisms in Dutch celiac disease patients. *European Journal of Human Genetics*, 1-4, 2004.

van Oosterhout A. j. M., Deurloo D. T., Groot P. C. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 polymorphisms and allergic asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 34:4-8, 2004.

Vijaykrishnan L., Slavik J. M., Illés Z., Greenwald R. J., Rainbow D., Greve B., Peterson L. B., Hafler D. A., Freeman G. J., Sharpe A. H., Wicker L. S., Kushroo V. K. An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity*, 20:563-575, 2004.

Wang X. B., Kakoulidou M., Giscombe R., Qiu Q., Huang D. R., Pirskanen R., Lefvert A. K. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect on AT-rich gene sequence. *Journal of Neuroimmunology*, 130:224-232, 2002.

Yanagawa T., Hidaka Y., Guimarães V., Soliman M., DeGroot L. J. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a caucasian population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80(1):41-45, 1995.

Yanagawa T., Gomi K., Nakao E. I., Inada S. CTLA-4 gene polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 27(12):2740-2742, 2000.

Yanagawa T., Hidaka Y., Guimarães V., Soliman M. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80(1):41-45, 2007.

Yee L. J., Perez K. A., Tang J., van Leeuwen D. J., Kaslow R. A. Association of CTLA-4 polymorphisms with sustained response to interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 187:1264-1271, 2003.

Zalatel K., Krhin B., Gaberscek S., Hojker S. Thyroid autoantibody production is influenced by exon 1 and promoter CTLA-4 polymorphisms in patients with Hashimoto's thyroiditis. *International Journal of Immunogenetics*, 33:87-91, 2006.

Zalloua P. A., Abchee A., Shbaklo H., Zreik t. G., Terwedow H., Halaby G., Azar S. T. Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene. *Human Immunology*, 65:719-724, 2004.

Zondervan K. T., Cardon L. R. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nature Reviews – Genetics*, 5:89-100, 2004.