

# Frequência de polimorfismo de nucleotídeo único de alguns genes da resposta imune em amostra populacional da cidade de São Paulo, Brasil

Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a population sample from São Paulo, Brazil

Léa Campos de Oliveira<sup>1,2</sup>, Rajendranath Ramasawmy<sup>1</sup>, Jaila Dias Borges<sup>3</sup>, Maria Lucia Carnevale Marin<sup>1</sup>, Natalie Guida Muller<sup>1</sup>, Jorge Kalil<sup>1,4,5</sup>, Anna Carla Goldberg<sup>1,3,5</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Apresentar a frequência de polimorfismo de nucleotídeo único de alguns genes da resposta imune em amostra populacional da cidade de São Paulo (SP). **Métodos:** Foram apresentadas as frequências de alelos de conhecidos polimorfismos de genes de imunidade inata e adquirida, a maioria com impacto funcional comprovado. Os dados foram coletados a partir de amostras de indivíduos saudáveis, irmãos não-HLA idênticos, de receptores de transplante de medula óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, obtidos entre 1998 e 2005. O número de amostras variou para cada polimorfismo de nucleotídeo único analisado por reação em cadeia pela polimerase seguida de clivagem com enzimas de restrição. **Resultados:** Apresentou-se a distribuição de alelos e genótipos de 41 polimorfismos genéticos, a maioria de genes para citocinas, mas também incluindo outros genes de resposta imune. **Conclusão:** Acreditamos que os dados apresentados aqui possam ser de grande valor para definir quais os polimorfismos presentes em frequências relevantes, para estudos caso-controle e para avaliar alvos de intervenção terapêutica nas doenças poligênicas com componente de resposta imune ou inflamatória.

**Descritores:** Polimorfismo genético; Imunidade inata; Citocinas

## ABSTRACT

**Objective:** To present the frequency of single nucleotide polymorphisms of a few immune response genes in a population sample from São Paulo City (SP), Brazil. **Methods:** Data on allele frequencies of

known polymorphisms of innate and acquired immunity genes were presented, the majority with proven impact on gene function. Data were gathered from a sample of healthy individuals, non-HLA identical siblings of bone marrow transplant recipients from the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, obtained between 1998 and 2005. The number of samples varied for each single nucleotide polymorphism analyzed by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme cleavage. **Results:** Allele and genotype distribution of 41 different gene polymorphisms, mostly cytokines, but also including other immune response genes, were presented. **Conclusion:** We believe that the data presented here can be of great value for case-control studies, to define which polymorphisms are present in biologically relevant frequencies and to assess targets for therapeutic intervention in polygenic diseases with a component of immune and inflammatory responses.

**Keywords:** Polymorphism, genetic; Immunity, innate; Cytokines

## INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que a variação genética individual é um componente essencial de respostas imunes em geral, que contribui para suscetibilidade, evolução, e desfecho de doenças infecciosas e autoimunes, além de câncer. Inúmeros estudos revelaram a extensão da variação genética humana enquanto tentavam mapear seu papel em doenças multifatoriais e poligênicas. Esses estudos

*Estudo realizado no Instituto do Coração da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil; Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – IIEPAE, São Paulo (SP), Brasil; Instituto de Investigação em Imunologia dos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia – INCT, São Paulo (SP), Brasil.*

<sup>1</sup> Instituto do Coração, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Pediatria Clínica (LIM-36), Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – IIEPAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Divisão de Imunologia Clínica e Alergia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Instituto de Investigação em Imunologia dos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia – INCT, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Anna Carla Goldberg – Avenida Albert Einstein, 627, 2SS, Bloco A – Morumbi – CEP 05652-000 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: 11 2151-0941 – E-mail: goldberg@einstein.br

Data de submissão: 26/8/2010 - Data de aceite: 22/6/2011

Conflitos de interesse: nenhum

demonstraram que há tipos diferentes de variantes, que abrangem desde polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*), com uma só alteração de base, até sequências repetitivas curtas e médias, além de variações no número de cópias, que podem se estender ao longo de grande segmentos de cromossomos. Atualmente, no estudo *1000 Genomes Project*, genomas individuais estão sendo analisados com a finalidade de catalogar toda a extensão da variação genética humana. Iniciativas anteriores, como o HapMap, abordaram os SNPs para mapear variantes de genes que afetam saúde, doença, e respostas individuais a medicações e fatores ambientais. Hoje, o número de SNPs conhecidos está na faixa de 10 milhões e estima-se que o HapMap contenha 80% de todas as SNPs com frequências de > 10%<sup>(1)</sup> (os *links* úteis de Internet estão alistados no Anexo 1). Esses projetos têm uma característica comum: o mapeamento de centenas de milhares de variantes alélicas. As variantes úteis para esses estudos de associação do genoma (GWAS, do inglês *genome-wide association study*) exibem tipicamente frequências entre 0,5 e 5% e um grande número de casos e controles é necessário para obter um poder satisfatório. Por exemplo, um poder de 90% para detectar um alelo com uma frequência de 1%, com um fator de risco de 2 GWAS, demanda cerca de 20.000 amostras individuais<sup>(2)</sup>. Esse número pode ser consideravelmente menor (~300) para uma frequência alélica rara de aproximadamente 10%. Um bom exemplo são os estudos conduzidos pelo *Wellcome Trust Case Control Consortium*, que analisou vários milhares de indivíduos em varreduras genômicas a fim de mapear o risco genético para diabetes tipo 2, artrite reumatoide, e doença de Crohn, entre outras doenças-alvo estudadas<sup>(3)</sup>.

Por outro lado, o agrupamento de amostras também pode criar problemas. A heterogeneidade de doenças e diferenças populacionais agem como fatores de confusão, prejudicando a identificação de genes relevantes por causa do pequeno efeito que muitas das variantes têm sobre a doença em si.

O estudo do histórico genético de populações brasileiras sempre foi um tópico desafiador. Não há apenas um alto grau de miscigenação, mas também os dados colhidos de diferentes correntes migratórias diferem de uma região para a outra. As etnias ameríndia, caucasiana e africana contribuíram para essa verdadeira “mistura” desde o início da colonização pelos portugueses, há cinco séculos. Estudos que visam avaliar a relativa contribuição das três raças que formam o *pool* genético da população brasileira por meio de descendências matrilinear<sup>(4)</sup> e patrilinear<sup>(5)</sup>, usando mtDNA e métodos baseados no cromossomo Y, confirmam os dados históricos de entrecruzamentos entre homens europeus e mulheres ameríndias e africanas<sup>(6,7)</sup>.

Na Região Sudeste do Brasil, onde se localiza a cidade de São Paulo (SP), a composição da mistura inclui maioria de italianos, espanhóis e alemães. Entretanto, essa região também recebeu contribuição significativa de africanos e povos indígenas. Além disso, como a cidade mais populosa da América do Sul, São Paulo sempre foi um importante destino de migrantes de outros locais do Brasil e de países vizinhos. Para justificar a mistura genética existente, alguns marcadores substitutos, tais como cor de pele, são empregados em muitos estudos. Todavia, Parra et al.<sup>(6)</sup> demonstraram que, em brasileiros, essa é uma substituição inadequada para ancestrais individuais. Escolhemos analisar indivíduos saudáveis, do mesmo nível socioeconômico que os pacientes atendidos no maior hospital de São Paulo. Esses indivíduos espelham a grande diversidade presente na população de São Paulo e, embora marcadores de ancestrais não tenham sido analisados, achamos que a informação deve ser relatada para ficar disponível para outros pesquisadores de campo, em sua busca por genes candidatos a estudos caso-controle dos muitos tipos diferentes de doenças que afligem os 19 milhões de habitantes da região metropolitana estendida de São Paulo.

Os dados mostrados neste trabalho incluem frequências de alelos de genes polimórficos em imunidade inata e adquirida, na maioria com impacto comprovado sobre a função gênica. A maioria dos polimorfismos mostrados aqui tem um impacto sobre os níveis de transcrição. Outros levam a alterações na força de ligação a seus ligantes correspondentes e/ou na transdução do sinal intracelular, e mesmo na meia-vida dos RNAs mensageiros.

O escopo deste trabalho não inclui informações detalhadas sobre os genes ou seus polimorfismos, que podem ser acessados em bons livros-texto<sup>(8)</sup>.

## Genes imunes inatos

O sistema imune inato depende da presença de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) em superfícies microbianas, o que resulta na ativação de células efetoras capazes de eliminar infecção e induzir inflamação nesse processo. Essas moléculas de reconhecimento tipo padrão podem ser associadas a células, como é o caso dos receptores *Toll-like* (TLRs)<sup>(9,10)</sup>, ou solúveis, como no caso da família de proteínas lectinas que se ligam a manose<sup>(11)</sup>.

TLRs são expressos predominantemente em células apresentadoras de antígenos, na superfície (TLR 1, 2, 4, 6) ou no interior (TLR 3, 7, 9). Cada uma reconhece um PAMP específico, como o lipopolissacarídeo bacteriano *Gram*-negativo (TLR-4), flagelina (TLR-5), RNA viral

de hélice única (TLR-7) ou dupla (TLR-3), DNA CpG derivado de bactéria (TLR-9). O TLR-4 é o principal representante da família, e é conhecido por responder a ligantes exógenos e endógenos, participando de respostas inflamatórias e locais do tecido a ferimentos, hipóxia ou outras formas de estresse. A resposta diminuída a lipopolissacarídeos foi mapeada para substituições de aminoácidos no gene TLR4<sup>(12)</sup>.

O sistema do complemento pode ser ativado de formas diferentes: uma das quais é a via da lectina, iniciada pela lectina ligadora-de-manose (MBL), revisado com detalhes por Dommett et al.<sup>(13)</sup>. A MBL é um reagente de fase aguda que se liga à manose, açúcares e outros compostos microbianos por meio do domínio lectina. Uma vez ativada, a cascata começa com a clivagem de C4 e C2, por meio de MASP-1 e -2 ativado por MBL. É intrigante que MBL-2, a forma funcional de MBL em seres humanos, contém polimorfismos em regiões de codificação que levam a substituições de aminoácidos não preservadas. Além disso, existem polimorfismos promotores com forte desequilíbrio de ligação, o que resulta em haplótipos estendidos. Observa-se que a frequência desses alelos varia muito ao redor do mundo, e muitas doenças diferentes, infecciosas ou não, já foram estudadas<sup>(13)</sup>.

### Interleucina 10 e genes receptores

A interleucina (IL) 10 é a citocina efetora de regulação negativa prototípica na resposta imune. Sua ação é essencial para o controle da inflamação que acompanha respostas imunes. A ausência de IL-10 em modelos animais de doença leva a dano tissular, autoimunidade, ou infecção crônica. IL-10 é produzida por muitas células imunes diferentes, como macrófagos e células dendríticas, e linfócitos TH1, TH2 e TH17. Age contra a produção de interferon gama pró-inflamatório e aumenta a diferenciação de células T regulatórias<sup>(14)</sup>. O gene que codifica IL-10 é altamente polimórfico, apresentando diferentes variantes na região 5', e promotora com impacto sobre a produção *in vitro* e *in vivo*<sup>(15,16)</sup>. IL-10 exerce suas ações por meio do receptor heterodimérico específico IL-10, em que a cadeia 1 é responsável pela alta afinidade de ligação<sup>(17)</sup>.

### Genes imunomoduladores na região de MHC classe III

Vários genes imunomoduladores se localizam na região de MHC (do inglês *major histocompatibility complex*) classe III. Além das bem conhecidas citocinas inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e linfotóxina alfa (LT- $\alpha$ ), polimorfismos funcionais estão sendo estudados em genes descritos recentemente, como *HLA-B associated transcript 1* (BAT1), *nuclear*

*factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1* (NFKBIL1) e *leukocyte-specific transcript 1* (LST1)<sup>(18)</sup>. O papel funcional exato desses três genes ainda não está claro.

BAT1, o mais telomérico dos três genes, é uma helicase *RNA DEAD-box*, um dos vários genes dessa região envolvidos no processamento de RNA<sup>(19)</sup> e um alvo importante para evasão imunológica por citomegalovírus<sup>(20)</sup>. NFKBIL1, uma proteína com certo grau de homologia com a família I $\kappa$ B, foi sugerida como participante no controle do *nuclear transcription factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) citosólico, uma molécula importante que governa a transcrição de mais de 200 diferentes genes de resposta imunológica<sup>(21)</sup>. Um trabalho detalhado<sup>(22)</sup> mostrou recentemente que NFKBIL1 é expresso em todos os tecidos, e que a proteína está presente em macrófagos e células T na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide. Ademais, a despeito da aparente homologia, esse produto se liga ao mRNA e parece funcionar no processamento de RNA. Finalmente, LST1 é traduzido para múltiplas isoformas com expressão que varia de acordo com o tipo celular e a forma de indução. A expressão em células imunes é ampla e, como regra, leva a uma proliferação linfocitária diminuída.

### IL-4, 5, 13 e genes receptores

IL-4 é uma citocina pleiotrópica essencial para a síntese de IgE em células B e para a diferenciação de células T no fenótipo TH2<sup>(23)</sup>. As células Th2 secretam IL-4, IL-13 e IL-5. Os mastócitos também secretam IL-5, e essa IL ativa eosinófilos. IL-5, juntamente de IL-4 e IL-13, está intensamente envolvida na indução e na manutenção de processos alérgicos. As funções de IL-13 na vigilância imunológica e na resposta imunológica tipo TH2 se sobrepõem com IL-4, mas IL-13 também tem um impacto sobre a eosinofilia tissular, além de remodelamento do tecido e desenvolvimento de fibrose<sup>(24)</sup>. Tanto o gene IL-4 como o IL-13 alojam polimorfismos com relevância funcional. A atividade biológica dessas duas citocinas ocorre por meio de ligação em células-alvo ao seu receptor específico. IL-13, que compartilha várias funções biológicas com IL-4, opera por meio do receptor IL-13, um heterodímero formado pelo compartilhamento das cadeias IL-4R $\alpha$  e IL-13R $\alpha$ .

### Outros genes de citocinas e quimiocinas

Uma grande variedade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, e outras moléculas é produzida no início ou durante a expansão de respostas imunes inatas e adquiridas. O tipo de desencadeamento, o local do tecido e a combinação da contribuição de diferentes

moléculas modelam a resposta imune nascente, definindo o tipo predominante de célula e o portfólio de moléculas efetoras produzidas, conforme Amsen et al.<sup>(23)</sup> e Pulendran et al.<sup>(25)</sup>. A cascata de eventos pró-inflamatórios é bem conhecida, e duas das moléculas efetoras clássicas envolvidas são IL-12 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Ademais, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein 1*) e receptor de quimiocina 5 (CCR5, do inglês *chemokine C-C motif receptor 5*) são, respectivamente, quimiocina e receptor de quimiocina que desempenham importantes papéis em eventos pró-inflamatórios<sup>(8)</sup>. CTLA-4 (do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) é um ligante essencial que governa a atividade de linfócitos T. Assim, os polimorfismos funcionais que modificam níveis ou a eficiência de quaisquer dessas moléculas poderão ter um impacto sobre o desfecho da resposta imune em função do desvio do equilíbrio de respostas inflamatórias e regulatórias. Os polimorfismos apresentados aqui foram amplamente estudados, e demonstraram desempenhar um papel em várias doenças infecciosas e autoimunes.

## OBJETIVO

Apresentar a frequência de SNPs de alguns genes de resposta imune em uma amostra populacional da cidade de São Paulo.

## MÉTODOS

### Sujeitos

Os dados neste estudo foram colhidos de uma amostra de indivíduos saudáveis, irmãos idênticos não-HLA de receptores de transplante de medula óssea atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, obtidos entre 1998 e 2005. Esses indivíduos foram selecionados, de forma clínica e laboratorial, como possíveis doadores, e considerados aptos para a doação, mas foram dispensados em função de incompatibilidade MHC com os respectivos receptores. As amostras foram obtidas após o consentimento informado e a permissão do Comitê de Ética do hospital. Como o número da amostra variou para cada SNP analisado, os números (n) são mostrados nas tabelas 1-5.

### Extração e genotipagem de DNA

Foram colhidas amostras de sangue; o DNA foi extraído por brometo de dodeciltrimetilamônio/brometo de cetiltrimetilamônio (DTAB/CTAB)<sup>(26)</sup> ou, como alternativa, por métodos *salting-out*<sup>(27)</sup>.

## Genotipagem com RFLP-PCR

Não houve desvio das proporções esperadas de Hardy-Weinberg em quaisquer dos genes analisados. Para a genotipagem de todos os SNPs, foi usado DNA genômico 100 ng. Os polimorfismos foram tipados por PCR-RFLP, conforme descrição em outra publicação (informações adicionais sobre os SNPs apresentados estão disponíveis no Anexo 2 e mediante solicitação). Em suma, os PCRs foram realizados em um volume final de 25  $\mu$ L contendo 100 ng de DNA genômico, 40  $\mu$ M de dNTP e 0,2 U de Taq polimerase, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 pM de cada *primer*. Em alguns casos, os protocolos empregaram 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,5 pM de cada *primer*. Em geral, o PCR foi conduzido com um passo inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos a 95°C por 20 segundos, anelamento por 30 segundos, seguido de uma extensão a 72°C por 20 segundos, e um passo final de extensão de 5 a 7 minutos a 72°C. Uma alíquota de 10  $\mu$ L do produto PCR foi digerido por 3 horas com a enzima de restrição específica (*New England Biolabs*) em um volume total de 20  $\mu$ L na temperatura especificada pelo fabricante. Os produtos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2 a 4%, tingidos com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

## RESULTADOS

A distribuição de alelos e genótipos de 41 diferentes polimorfismos de genes, a maioria citocinas, mas também incluindo outros genes de resposta imune, é mostrada nas tabelas 1 a 5.

**Tabela 1.** Genótipos e frequências de alelos de polimorfismos de genes imunes inatos em uma amostra de indivíduos saudáveis

SNP	Alelos	Genótipos (%)	FA
TLR4 +896, n = 255	AA	223 (87,4)	0,94
	AG	31 (12,2)	
	GG	1 (0,4)	
TLR5 +1174, n = 279	CC	261 (93,5)	0,97
	CT	17 (6,1)	
	TT	1 (0,4)	
MBL-550, n = 281	CC	117 (41,5)	0,65
	CG	134 (48)	
	GG	30 (10,5)	
MBL-221, n = 281	CC	10 (4,0)	0,16
	CG	69 (24)	
	GG	202 (72)	
MBL +4, n = 281	CC	158 (56)	0,74
	CT	101 (36)	
	TT	22 (8,0)	
MBL 52*, n = 281	CC	259 (92,1)	0,96
	CT	21 (7,5)	
	TT	1 (0,4)	
MBL 54*, n = 281	AA	6 (2)	0,14
	GA	64 (23)	
	GG	210 (75)	
MBL 57*, n = 281	GG	262 (93)	0,96
	GA	19 (7)	
	AA	0	
MBL A/O**, n = 281	A/A	176 (63)	0,80
	A/O	91 (32)	
	O/O	14 (5)	
MASP2 120, n = 281	GG	269 (96)	0,98
	GA	12 (4)	
	AA	0	

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; FA: frequência de alelos; \* códon; \*\*C+D+E, que corresponde a variantes nas posições 52,54,57.

**Tabela 2.** Genótipos e frequências de alelos de IL-10 e polimorfismos do gene receptor de IL-10 em uma amostra de indivíduos saudios

SNP	Alelos	Genótipos (%)	FA
IL-10 -592, n = 278	AA	38 (14)	0,35
	AC	119 (43)	
	CC	121 (43)	
IL-10 -819, n = 278	CC	120 (43)	0,65
	TC	120 (43)	
	TT	38 (14)	
IL-10 -1082, n = 278	AA	137 (49,3)	0,7
	AC	115 (41,4)	
	CC	26 (9,3)	
IL-10 -2763, n = 278	AA	29 (10)	0,25
	AC	83 (30)	
	CC	166 (60)	
IL-10 -2849, n = 278	AA	15 (5,4)	0,18
	AG	68 (24,5)	
	GG	195 (70,1)	
IL-10 -3575, n = 278	TT	163 (59)	0,76
	TA	98 (35)	
	AA	17 (6)	
IL10R 138*, n = 265	AA	211 (80)	0,9
	AG	49 (18)	
	GG	5 (2)	
IL10R 330*, n = 259	GG	151 (58,3)	0,76
	AG	94 (36,3)	
	AA	14 (5,4)	

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; FA: frequência de alelos; \* códon.

**Tabela 3.** Genótipos e frequências de alelos (FA) de polimorfismos do gene receptor de MHC III em uma amostra de indivíduos saudios

SNP	Alelos	Genótipos (%)	FA
TNFA -238, n = 281	AA	1 (0,4)	0,04
	AG	18 (6,4)	
	GG	262 (93,2)	
TNFA -308, n = 281	AA	4 (1)	0,1
	AG	45 (16)	
	GG	232 (83)	
LTA +80, n = 273	CC	116 (42)	0,6
	AC	114 (42)	
	AA	43 (16)	
LTA +252, n = 279	AA	132 (47,3)	0,7
	AG	118 (42,3)	
	GG	29 (10,4)	
NFKBIL1 -63, n = 276	AA	38 (14)	0,35
	AT	118 (43)	
	TT	120 (43)	
BAT1 -22, n = 265	GG	127 (48)	0,7
	CG	110 (41,5)	
	CC	28 (10,5)	
BAT1 -348, n = 266	CC	192 (72)	0,85
	CT	68 (26)	
	TT	6 (2)	
LST1 +290, n = 141	AA	7 (5)	0,09
	AG	10 (7)	
	GG	124 (88)	

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; FA: frequência de alelos.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho apresentamos uma série de frequências de alelos e genótipos de genes de respostas imunes conhecidos e novos. Embora esses genes demonstrem uma modesta contribuição ao fenótipo geral, é importante detalhar os efeitos de cada gene no desenvolvimento e evolução de uma determinada doença. A soma de múltiplos fatores genéticos e ambientais leva a diferentes apresentações clínicas e respostas terapêuticas em cada paciente<sup>(28)</sup>. Assim, o estudo de números significantes

**Tabela 4.** Genótipos e frequências de alelos de IL4, IL5, IL13 e polimorfismos do gene receptor em uma amostra de indivíduos saudios

SNP	Alelos	Genótipos (%)	FA
IL5 - 746, n = 128	CC	20 (16)	0,43
	CT	71 (55)	
	TT	37 (29)	
IL4 -589, n = 180	TT	21 (11)	0,31
	CT	68 (38)	
	CC	91 (51)	
IL4 +33, n = 220	TT	30 (14)	0,31
	CT	77 (35)	
	CC	113 (51)	
IL4 +3017, n = 86	GG	15 (17,4)	0,51
	GT	58 (67,4)	
	TT	13 (15,2)	
IL13 +2044, n = 160	AA	6 (4,0)	0,2
	AG	60 (37,0)	
	GG	94 (59,0)	
IL4R +223, n = 212	A/A	49 (19)	0,50
	A/G	129 (61)	
	G/G	43 (20)	
IL13RA1 +1398, n = 85	AA	57 (67)	0,76
	AG	16 (19)	
	GG	12 (14)	

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; FA: frequência de alelos.

**Tabela 5.** Genótipos e frequências de alelos de vários polimorfismos do gene de resposta imune em uma amostra de indivíduos saudios

SNP	Alelos	Genótipos (%)	FA
IL6 -174, n = 264	GG	168 (64)	0,8
	CG	83 (31)	
	CC	13 (5)	
INFG +874, n = 273	AA	95 (35)	0,6
	AT	129 (47)	
	TT	49 (18)	
IL12B +1188, n = 266	AA	134 (50)	0,7
	AC	109 (41)	
	CC	23 (9)	
CCR5Δ32, n = 278	WT*WT	252 (90)	0,95
	DEL**WT	24 (9)	
	DEL/DEL	2 (1)	
MCP1 -2518, n = 256	AA	122 (48)	0,7
	AG	103 (40)	
	GG	31 (12)	
CTLA4-318, n = 217	CC	191 (88)	0,93
	CT	23 (11)	
	TT	3 (1)	
CTLA4 +49, n = 228	AA	94 (41)	0,66
	AG	113 (50)	
	GG	21 (9)	
CTLA4 CT60, n = 181	AA	42 (23)	0,47
	AG	87 (48)	
	GG	52 (29)	

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; FA: frequência de alelos; \* tipo selvagem; \*\* deleção.

de pacientes portadores da mesma doença, além da comparação entre doenças similares (por exemplo, doenças autoimunes), abre caminho para identificação de relevantes mecanismos em sua fisiopatologia. Polimorfismos genéticos, como aqueles mostrados neste trabalho, foram associados a uma variedade de doenças autoimunes, inflamatórias e infecciosas, que abrangem desde doença celíaca e artrite reumatoide, a infarto agudo do miocárdio, doença de Chagas e hepatite viral.

A maioria de sítios polimórficos no genoma é mundialmente comum em populações, e as variantes exibem moderada frequência<sup>(29)</sup>, sugerindo que boa parte deve ter passado por uma seleção de equilíbrio, isto é, que tem sido preservada porque, além de conceder suscetibilidade a certas doenças, também desempenham um papel benéfico segundo o histórico ambiental das populações. Dois importantes pontos devem ser

destacados a respeito de alguns dos polimorfismos que estudamos, os quais mostraram frequências muito baixas (por exemplo, TNF- $\alpha$ 238 e TLR5 +1174). Baixas frequências causam um impacto sobre o poder estatístico, e um número de amostras bem maior precisa ser examinado para alcançar significância em estudos de associação. Quando o impacto da variante sobre um fenótipo é baixo, a questão se complica ainda mais. Em estudos com genes candidatos, em que casos e controles tipicamente somam apenas algumas centenas, esta é uma questão importante e deve ser levada em consideração na escolha de genes-alvo. Por outro lado, genes com efeitos maiores podem ser analisados com confiança.

Algumas considerações poderão ajudar a contornar ou amenizar o impacto das questões apontadas anteriormente: em primeiro lugar, é necessário haver uma hipótese robusta com base em evidência clínica. Deve ser destacado que, enquanto a triagem de estudos de associação do genoma não emprega hipóteses *a priori*, estudos caso-controle serão beneficiados da correlação com dados obtidos por meio de um cuidadoso seguimento clínico e dados laboratoriais detalhados. As escolhas de marcadores opcionais no mesmo gene ou região cromossômica, a análise em amostras subsequentes independentes, o uso de duas a quatro vezes mais amostras de controles do que de pacientes, e o cuidado de evitar estruturas populacionais ocultas, que podem resultar em falsas diferenças, são pontos adicionais a serem considerados. Embora muitas declarações de associações tenham sido publicadas, poucas são subsequentemente replicadas, e esse é um problema que afeta igualmente estudos GWAS<sup>(2,30)</sup>.

Todavia, como salientado por Eric Lander et al.<sup>(2)</sup>, ainda há um papel para estudos de associação. O principal valor do mapeamento genético não é a previsão de risco, mas o fornecimento de novos *insights* sobre os mecanismos de doença. O conhecimento das vias da doença pode sugerir estratégias para prevenção, diagnóstico e terapia.

## CONCLUSÃO

Finalmente, embora os ancestrais não tenham sido definidos na nossa população de estudo, cremos que os dados apresentados aqui possam ser de grande valor para estudos caso-controle, para definir quais polimorfismos estão presentes com frequências biologicamente relevantes, e para avaliar alvos para intervenção terapêutica em doenças poligênicas com um componente de resposta imune e inflamatória.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

bolsas 2001/09850-0 e 2005/00553-3, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bolsa 0062/2001-0. ACG e JK são receptores de doações pessoais do CNPq.

## REFERÊNCIAS

1. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437(7063):1299-320.
2. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science*. 2008;322(5903):881-8.
3. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
4. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000;67(2):444-61.
5. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet*. 2001;68(1):281-6.
6. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Parra, F.C., et al., Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):177-82.
7. Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Struchiner CJ, Bastos-Rodrigues L, Pena SD. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(9):765-71.
8. Kindt TJG, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby Immunology. 6th ed. New York: W.H. Freeman; 2007.
9. Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol*. 2006;7(1):40-8.
10. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987-95.
11. Garred P, Honoré C, Ma YJ, Munthe-Fog L, Hummelshøj T. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. *Mol Immunol*. 2009;46(14):2737-44.
12. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M et al., TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000;25(2):187-91.
13. Dommert RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*. 2006;68(3):193-209.
14. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-81.
15. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997;24(1):1-8.
16. Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim JS, Kim JW. Interleukin-10 haplotype associated with total serum IgE in atopic dermatitis patients. *Allergy*. 2005;60(9):1146-51.
17. Gasche C, Grundtner P, Zwirn P, Reinisch W, Shaw SH, Zdanov A. Novel variants of the IL-10 receptor 1 affect inhibition of monocyte TNF-alpha production. *J Immunol*. 2003;170(11):5578-82.
18. Koch W, Hoppmann P, Michou E, Jung V, Pfeufer A, Mueller JC et al. Association of variants in the BAT1-NFKBIL1-LTA genomic region with protection against myocardial infarction in Europeans. *Hum Mol Genet*. 2007;16(15):1821-7.
19. Lehner B, Semple JI, Brown SE, Counsell D, Campbell RD, Sanderson CM. Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region. *Genomics*. 2004;83(1):153-67.
20. Lischka P, Toth Z, Thomas M, Mueller R, Stamminger T. The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase

UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA. *Mol Cell Biol.* 2006;26(5):1631-43.

21. Carlsen H, Alexander G, Austenaa LM, Ebiara K, Blomhoff R. Molecular imaging of the transcription factor NF-kappaB, a primary regulator of stress response. *Mutat Res.* 2004;551(1-2):199-211.

22. Greetham D, Ellis CD, Mewar D, Fearon U, an Ultaigh SN, Veale DJ et al., Functional characterization of NF-kappaB inhibitor-like protein 1 (NFkappaBIL1), a candidate susceptibility gene for rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet.* 2007;16(24):3027-36.

23. Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol.* 2009;21(2):153-60.

24. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:425-56.

25. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol.* 2010;11(8):647-55.

26. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques.* 1991;11(3):298-300, 302.

27. Fernandez-Vina M, Moraes JR, Moraes ME, Miller S, Stastny P. HLA class II haplotypes in Amerindians and in black North and South Americans. *Tissue Antigens.* 1991;38(5):235-7.

28. Loscalzo J, Kohane I, Barabasi AL. Barabasi, Human disease classification in the postgenomic era: a complex systems approach to human pathobiology. *Mol Syst Biol.* 2007;3:124

29. Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet.* 2001;17(9):502-10..

30. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet.* 2003;33(2):177-82.

**Anexo 1. Links úteis**

- Projeto Internacional Hapmap (<http://snp.cshl.org/>)  
 Projeto 1000 Genomas ([http:// www.1000genomes.org/page.php](http://www.1000genomes.org/page.php))  
 Banco de dados de variantes genômicas, um banco de dados sobre variações de número de cópias em humanos (<http://projects.tcag.ca/variation/>)  
 Entrez SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)  
 Consórcio de casos-controle da Wellcome Trust (<http://www.wtccc.org.uk/>)

**Anexo 2. Identificação de polimorfismo de nucleotídeo único e referências**

Genes	rs	SNP	Referências
IL-6 -174	rs1800795	G/C	Sainz J, Pérez E, Gómez-Lopera S, López-Fernández E, Moratalla L, Oyonarte S, Jurado M. Genetic variants of IL6 gene promoter influence on C-reactive protein levels but are not associated with susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients <i>Cytokine.</i> 2008;(3):268-78.
IL-10R 138	rs 4252272	A/G	Gasche C, Grundtner P, Zwirn P, Reinisch W, Shaw SH, Zdanov A, et al. Novel variants of the IL-10 receptor 1 affect inhibition of monocyte TNF-alpha production. <i>J Immunol.</i> 2003;170(11):5578-82
IL-10R 330	rs2229113	G/A	Gasche C, Grundtner P, Zwirn P, Reinisch W, Shaw SH, Zdanov A, et al. Novel variants of the IL-10 receptor 1 affect inhibition of monocyte TNF-alpha production. <i>J Immunol.</i> 2003;170(11):5578-82
IL-10 -592	rs1800872	C/A	Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. <i>Blood.</i> 2004;103(9):3529-34.
IL-10 -819	rs1800871	C/T	Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. <i>Blood.</i> 2004;103(9):3529-34.
IL-10 1082	rs1800896	A/G	Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. <i>Blood.</i> 2004;103(9):3529-34.
IL-10 -2849	rs6703630	G/A	Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME, et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. <i>Immunogenetics.</i> 2003;54(12):896-9.
IL-10 -2763	rs6693899	C/A	Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME, et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. <i>Immunogenetics.</i> 2003;54(12):896-9.
IL-10 -3575	rs1800890	T/A	Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME, et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. <i>Immunogenetics.</i> 2003;54(12):896-9.
INFG +874	rs2430561	A/T	Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. <i>Hum Immunol.</i> 2000;61(9):863-6.
IL-12B 1188	rs3212227	A/C	van Veen et al., <i>Genes and Immunity.</i> 2000;1:219-24
CCR5[delta]32	rs333	del	Shahbazi M, Ebadi H, Fathi D, Roshandel D, Mahamadhoseeni M, Rashidbaghan A, et al. CCR5-delta 32 allele is associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Iranian population. <i>Cell Mol Neurobiol.</i> 2009;29(8):1205-9.
TLR4 299D/G 896	rs4986790	A/G	Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Borba SC, Teixeira PC, Ferreira SC, et al. Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. <i>J Infect Dis.</i> 2009;199(12):1838-45.
MBL57 Gly/Asp	rs1800451	G/A	Ramasawmy R, Spina GS, Fae KC, Pereira AC, Nisihara R, Messias Reason IJ, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. <i>Clin Vaccine Immunol.</i> 2008;15(6):932-6 / Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. <i>Hum Mol Genet.</i> 1992;1(9):709-15.
MBL52 Arg/Cys	rs5030737	C/T	Ramasawmy R, Spina GS, Fae KC, Pereira AC, Nisihara R, Messias Reason IJ, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. <i>Clin Vaccine Immunol.</i> 2008; 15(6):932-936/ Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. <i>Biochem Soc Trans.</i> 2008;36:1461-6.

Continua...

...Continuação

**Anexo 2. Identificação de polimorfismo de nucleotídeo único e referências**

MBL54 Gly/Asp	rs1800450	G/A	Ramasawmy R, Spina GS, Fae KC, Pereira AC, Nishihara R, Messias Reason IJ, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. <i>Clin Vaccine Immunol.</i> 2008;15(6):932-6.
MBL-221 X/Y	rs7096206	G/C	Laisk T, Peters M, Saare M, Haller-Kikkatalo K, Karro H, Salumets A. Association of CCR5, TLR2, TLR4 and MBL genetic variations with genital tract infections and tubal factor infertility. <i>J Reprod Immunol.</i> 2010; Jul 1. [Epub ahead of print]
MBL-550 H/L	rs11003125	C/G	Laisk T, Peters M, Saare M, Haller-Kikkatalo K, Karro H, Salumets A. Association of CCR5, TLR2, TLR4 and MBL genetic variations with genital tract infections and tubal factor infertility. <i>J Reprod Immunol.</i> 2010; Jul 1. [Epub ahead of print]
MBL +4 P/Q	rs7095891	C/T	Laisk T, Peters M, Saare M, Haller-Kikkatalo K, Karro H, Salumets A. Association of CCR5, TLR2, TLR4 and MBL genetic variations with genital tract infections and tubal factor infertility. <i>J Reprod Immunol.</i> 2010; Jul 1. [Epub ahead of print]
MASP2 120D/G	rs72550870	A/G	Ramasawmy R, Spina GS, Fae KC, Pereira AC, Nishihara R, Messias Reason IJ, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. <i>Clin Vaccine Immunol.</i> 2008;15(6):932-6.
NOD2 3020insC 1007fs	rs2066847	insC	Ghandil P, Chelala C, Dubois-Laforgue D, Senée V, Caillat-Zucman S, Kockum I, et al. Crohn's disease associated CARD15 (NOD2) variants are not involved in the susceptibility to type 1 diabetes. <i>Mol Genet Metab.</i> 2005;86(3):379-83.
MCP1 -2518	rs1024611	A/G	Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 1999;259(2):344-8.
TNFA -238	rs361525	G/A	Migot-Nabias F, Mombo LE, Luty AJ, Dubois B, Nabias R, Bisseye C, et al. Human genetic factors related to susceptibility to mild malaria in Gabon. <i>Genes Immun.</i> 2000;1(7):435-41.
TNFA -308	rs1800629	G/A	Bittencourt PL, Palácios SA, Caçado EL, Porta G, Drigo S, Carrilho FJ, et al. Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor alpha polymorphisms at position -308. <i>J Hepatol.</i> 2001;35(1):24-8.
LTA +80	rs2239704	A/C	Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Müller NG, Cavalcanti VL, Ferreira RC, et al. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. <i>J Infect Dis.</i> 2007;196(12):1836-43
LTA +252	rs909253	A/G	Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Müller NG, Cavalcanti VL, Ferreira RC, et al. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. <i>J Infect Dis.</i> 2007;196(12):1836-43
NFKB1L1 -63	rs2071592	T/A	Ramasawmy R, Faé KC, Cunha-Neto E, Borba SC, Ianni B, Mady C, et al. Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among Trypanosoma cruzi-infected individuals. <i>Mol Immunol.</i> 2008;45(1):283-8
BAT1 -22	rs2239527	C/G	Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Faé KC, Müller NG, Cavalcanti VL, Drigo SA, et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. <i>J Infect Dis.</i> 2006;193(10):1394-9.
BAT1 -348		C/T	Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Faé KC, Müller NG, Cavalcanti VL, Drigo SA, et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. <i>J Infect Dis.</i> 2006;193(10):1394-9.
LST1 +290		A/G	Rollinger-Holzinger I, Eibl B, Pauly M, Griesser U, Hentges F, Auer B, et al. LST1: a gene with extensive alternative splicing and immunomodulatory function. <i>J Immunol.</i> 2000;164(6):3169-76.
IL-4 -589	rs2243250	C/T	Verra F, Luoni G, Calissano C, Troye-Blomberg M, Perlmann P, Perlmann H, et al. IL-4-589C/T polymorphism and IgE levels in severe malaria. <i>Acta Trop.</i> 2004;90(2):205-9.
IL-4 +33	rs2070874	C/T	Shibata N, Ohnuma T, Takahashi T, Baba H, Ishizuka T, Ohtsuka M, et al. The effect of IL4 +33C/T polymorphism on risk of Japanese sporadic Alzheimer's disease. <i>Neurosci Lett.</i> 2002;323(2):161-3.
IL-4 +3017	rs2227284	G/T	Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, et al. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2004;114(1):80-7.
IL-13 Q110R	rs20541	G/A	Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. <i>Hum Mol Genet.</i> 2000;9(4):549-59.
IL-4R I50V	rs1805011	A/G	Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, et al. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. <i>J Immunol.</i> 1999;162(3):1227-31.
IL-5 -746	rs2069812	C/T	Hong SJ, Lee SY, Kim HB, Kim JH, Kim BS, Choi SO, et al. IL-5 and thromboxane A2 receptor gene polymorphisms are associated with decreased pulmonary function in Korean children with atopic asthma. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2005;115(4):758-63.
IL-13RA1 +1398		A/G	Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. <i>Hum Mol Genet.</i> 2000;9(4):549-59.
CTLA4 -49	rs231775	G/A	Fan LY, Tu XQ, Cheng QB, Zhu Y, Feltens R, Pfeiffer T, et al. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene polymorphisms confer susceptibility to primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis in Chinese population. <i>World J Gastroenterol.</i> 2004;10(20):3056-9.
CTLA4 -60	rs3087243	A/G	Brophy K, Ryan AW, Thornton JM, Abuzakouk M, Fitzgerald AP, McLoughlin RM, O'morain C, Kennedy NP, Stevens FM, Feighery C, Kelleher D, McManus R. Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. <i>Genes Immun.</i> 2006;7(1):19-26 / Hradsky O, Dusatkova P, Lenicek M, Bronsky J, Nevoral J, Vitek L, Lukas M, Zeniskova I, Cinek O. The CTLA4 variants may interact with the IL23R- and NOD2-conferred risk in development of Crohn's disease. <i>BMC Med Genet.</i> 2010;11:91.
CTLA -318	rs5742909	C/T	Fan LY, Tu XQ, Cheng QB, Zhu Y, Feltens R, Pfeiffer T, et al. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene polymorphisms confer susceptibility to primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis in Chinese population. <i>World J Gastroenterol.</i> 2004;10(20):3056-9.

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único.