



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

Renata Brant de Souza Melo

Análise de painel de genes informativos de ancestralidade e aspectos demográficos e clínicos em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo com esclerose múltipla

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Patologia.

Orientadora: Profa.Dra Doralina Guimarães Brum Souza

**Botucatu  
2016**

**Renata Brant de Souza Melo**

Análise de painel de genes informativos de ancestralidade e aspectos demográficos e clínicos em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo com esclerose múltipla

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestraem Patologia.

Orientadora: Profa.Dra Doralina Guimarães Brum Souza

**Botucatu  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Melo, Renata Brant de Souza.

Análise de painel de genes informativos de ancestralidade e aspectos demográficos e clínicos em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo com esclerose múltipla / Renata Brant de Souza Melo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Doralina Guimarães Brum Souza

Capes: 40101070

1. Esclerose múltipla. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Doenças Desmielinizantes. 4. Genética humana.

Palavras-chave: Desmielinizante; Esclerose múltipla; Genética.

Renata Brant de Souza Melo

Análise de painel de genes informativos de ancestralidade e aspectos demográficos e clínicos em pacientes da região noroeste do Estado de São Paulo com esclerose múltipla.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestra em patologia.

Orientador: Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza

Comissão examinadora

---

Profa. Dra. Doralina Guimarães Brum Souza  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

---

Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi  
Universidade de São Paulo (USP)

---

Prof. Dr. Fernando Coronetti Gomes da Rocha  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Botucatu, 31 de agosto de 2016.

**Dedico,**

*Aos meus pais, **Virgolino e Conceição**, que continuamente me apoiam e me dão  
exemplos de retidão e bom caráter.*

*Ao meu esposo, **Roni**, pelo amável companheirismo.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar condições de atuar na medicina e ajudar as pessoas;

Aos meus pais, **Virgolino e Conceição**, pela dedicação e integral amor;

Ao meu esposo, **Roni**, pela alegria de estar ao seu lado;

Aos meus amigos, especialmente **Kíria**, por sempre me acolher e à minha família, pela torcida;

À **Dra Doralina** pela confiança, ensinamentos e oportunidade dada ao conhecimento;

Ao **Dr Fernando Coronetti**, por ter me recebido tão gentilmente, no ambulatório de Neuroimunologia da UNESP;

Aos médicos da UNESP pela colaboração na coleta dos dados;

Aos amigos de Botucatu, especialmente **Andréia, Paula, Thálitta, Iane e Luana** pelas alegrias e força;

Aos funcionários da UNESP, especialmente à **Vânia Soler**, pela viabilização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho (processo nº 2012/508391);

Aos meus amigos da Santa Casa de Belo Horizonte, especialmente ao **Dr Antonio Pereira**, pelo incentivo à busca do aprendizado e compreensão das minhas ausências;

E, finalmente, aos pacientes, que de forma generosa me permitiram aprender a cada dia.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas  
Lista de Figuras  
Lista de Símbolos  
Lista de Abreviaturas e Siglas  
RESUMO  
*ABSTRACT*

|                                                          |               |
|----------------------------------------------------------|---------------|
| <i>Capítulo I.....</i>                                   | <i>15</i>     |
| 1.INTRODUÇÃO.....                                        | 16            |
| 1.1 Genes marcadores informativos de ancestralidade..... | 22            |
| 2.OBJETIVOS.....                                         | 29            |
| 3.MATERIAL E MÉTODOS.....                                | 30            |
| 4.RESULTADOS.....                                        | 32            |
| 5.DISSCUSSÃO.....                                        | 44            |
| 6.CONCLUSÃO.....                                         | 48            |
| ANEXOS.....                                              | 49            |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                          | 60            |
| <br><i>Capítulo II.....</i>                              | <br><i>66</i> |
| 1.INTRODUCTION.....                                      | 68            |
| 2.OBJECTIVE.....                                         | 69            |
| 3.MATERIALS AND METHODS.....                             | 70            |
| 4.RESULTS.....                                           | 70            |
| 5.DISCUSSION.....                                        | 71            |
| 6.CONCLUSION.....                                        | 73            |
| REFERENCES.....                                          | 73            |

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.Frequência alélica dos marcadores informativos de ancestralidade nas populações africanas, europeias e ameríndias.

Tabela2.Características gerais dos genes marcadores de ancestralidade.

Tabela 3. Estado de validação e alelo ancestral dos genes marcadores informativos de ancestralidade

Tabela 4. Aspectos gerais sobre os genes marcadores de ancestralidade

Tabela 5.Aspectos clínicos e demográficos de pacientes com esclerose múltipla da região noroeste do Estado de São Paulo

Tabela 6.Análise entre marcadores de ancestralidade e chance de diagnóstico de esclerose múltipla e controles.

Tabela 7.Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e idade de início da esclerose múltipla

Tabela 8.Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e idade de início, por faixa etária, na esclerose múltipla.

Tabela 8a.Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à idade estratificada na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS

Tabela 8a(continuação).Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à idade estratificada na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS

Tabela 9. Análise de associação entre idade de início, por estatificação, e marcadores de ancestralidade na esclerose múltipla

Tabela 10. Frequência alélica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto na esclerose múltipla mensurada pela Escala de EDSS.

Tabela 11. Frequência genotípica de marcadores de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto na esclerose múltipla mensurada pelo EDSS

Tabela 12. Relação entre marcadores de ancestralidade e gravidade do primeiro surto estratificada, menor ou igual a 2,5 e maior do que 2,5, pela Escala de EDSS nos pacientes com esclerose múltipla.

Tabela 13. Frequência alélica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação a gravidade do primeiro surto, estratificada em menor que 5 e maior ou igual a 5, na esclerose múltipla mensurada pela Escala de EDSS.

Tabela 14. Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto, estratificada em menor que 5 e maior ou igual a 5, na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS.

Tabela 14a. Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e gravidade na esclerose múltipla.

Tabela 14a (continuação). Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e gravidade na esclerose múltipla.

Tabela 15. Relação entre marcadores de ancestralidade e gravidade do primeiro surto estratificada, menor do que 5 e maior ou igual a 5, pela Escala de EDSS nos pacientes com esclerose múltipla.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genes envolvidos na via de diferenciação do linfócito Thelper, nas doenças inflamatórias desmielinizantes.

Figura 2. Prevalência mundial da esclerose múltipla (2013)

Figura 3. Frequências alélicas de 12 *ancestry informative markers* (AIMs) em europeus, africanos e ameríndios e a frequência alélica diferencial entre essas populações ancestrais.

Figura 4. Validação dos 12 AIMs componentes do painel na distinção das populações ancestrais europeia, africana e ameríndias por haplótipos cedidos por Mark Shriver

Figura 5. Estimativa de ancestralidade individual e por grupo de pacientes com EM e controles

Figura 6. Mapa da distribuição mundial dos alelos do gene *FY*.

Figura 7. Modo de ação da apoA-I

## LISTA DE SÍMBOLOS

- $>$  Maior
- $\geq$  Maior e igual
- $<$  Menor
- $\leq$  Menor e igual
- $\%$  Porcento
- $\delta$  Sigma

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |                                                  |
|---------------|--------------------------------------------------|
| A             | Adenina                                          |
| AFR           | Africana                                         |
| AIMs          | <i>Ancestry informative markers</i>              |
| AMER          | Ameríndia                                        |
| Apo A-I       | Apoliproteína A-I                                |
| ApoB          | Apoliproteína B                                  |
| C             | Citosina                                         |
| CT            | Colesterol total                                 |
| D ou del      | Deleção                                          |
| DA            | Dopamina                                         |
| DARC          | <i>Duffy antigen/chemokine receptor</i>          |
| EAE           | Encefalomielite autoimune experimental           |
| EDSS          | <i>Expanded disability status scale</i>          |
| EUR           | Europeia                                         |
| EM            | Esclerose Múltipla                               |
| G             | Guanina                                          |
| HDL           | <i>Highdensity lipoprotein</i>                   |
| I ou ins      | Inserção                                         |
| IL-1 $\beta$  | Interleucina-1 beta                              |
| LPL           | Lipoproteína lipase                              |
| N             | Número da amostra                                |
| OR            | <i>Odds Ratio</i>                                |
| P             | Valor de p                                       |
| PAGE          | PolyAcrylamide gel electrophoresis               |
| PCR           | <i>Polymerase chain reaction</i>                 |
| RFLP          | <i>Restriction fragmente length polymorphism</i> |
| SNC           | Sistema nervoso central                          |
| SNP           | <i>Single nucleotide polymorphism</i>            |
| T             | Timina                                           |
| TNF- $\alpha$ | <i>Necrosis fator tumoral-alfa</i>               |

## RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é a doença inflamatória autoimune mais comum do sistema nervoso central que acomete adultos jovens. É mais frequente no sexo feminino e em população caucasiana. Apresenta pior prognóstico nos homens, nos negros e naqueles com idade de início superior a 40 anos. Na maioria dos casos, manifesta-se na forma de surto-remissão, em que o paciente apresenta piora clínico-neurológica e melhora espontânea e parcial do quadro. Na recorrência dos surtos, há um acúmulo de déficits, ao longo do tempo e estas incapacidades que podem ser registradas através da escala do *EDSS* (derivado do inglês *Expanded Disability Status Scale*), cujos valores compreendem entre 0 a 10, sendo 0 a melhor condição do paciente e 10, o óbito. A etiologia permanece desconhecida, mas há evidências que fatores ambientais e genéticos contribuem para o desenvolvimento da doença. A população brasileira apresenta diferentes graus de miscigenação, resultante de intercruzamento da população europeia, africana e ameríndia, de acordo com as regiões do país. Tendo em vista esta peculiaridade e o fato de a EM ser mais grave nos afro-descendentes, bem como apresentar menor prevalência em população miscigenada, torna-se interessante o estudo do risco étnico e genético desta doença no Brasil. Em estudo prévio pelo mesmo grupo, a contribuição genética da população europeia, africana e ameríndia em pacientes com EM foi estimada utilizando um painel de 12 genes marcadores informativos de ancestralidade (derivado do inglês *ancestry informative markers\_AIMs*). Os principais genes utilizados para estimar a contribuição europeia foram *FY*, *SB19.3* e *APOA1*. Já para a contribuição ameríndia foram *PV92* e *CKM*. E, por último, para a africana, *AT3*, *LPL* e *MID575*. Os achados prévios evidenciaram que a contribuição europeia predomina na EM, seguida da africana e ameríndia. Similar ao que ocorre na população geral da região Sudeste do Brasil. Neste estudo, os *AIMs* foram analisados quanto a frequência dos seus alelos em relação as variáveis clínicas da EM, em amostra de pacientes da região Sudeste do Brasil, já que alguns destes genes tem papel na inflamação.

Palavras-chave: Esclerose múltipla, genética, desmielinizante.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is the most common autoimmune inflammatory disease of the central nervous system that affects young people. It is common in females and in Caucasians, with a ratio of worse prognosis in men, blacks and age of onset more than 40 years. In most patients manifests itself in the form of relapsing-remitting in which the patient presents worsening clinical and neurological and spontaneous and partial improvement of symptoms. In most recurrence of symptoms, there is an accumulation of deficits over time and these impairments are recorded by the EDSS(Expanded Disability Status Scale), whose values comprise between 0 to 10, with 0 the better the patient's condition and 10, death. There is interaction between environmental and genetic factors, but the etiology remains unknown. The Brazilian population is five centuries of crossbreeding between populations. European, African and Amerindian and may have different degrees of miscegenation, according to the regions. In view of this peculiarity and the fact that MS is more severe in Afro-descendants, it is interesting the study of ethno-genetic risk of this disease in Brazil. And for that, the ancestry informative markers (AIMs) will be used as a robust tool in the study of case-control in order to avoid spurious association. They are markers of specific population- and has different frequencies in different populations. To estimate the genetic contribution of each population, in the Brazilian population, one AIMs panel of 12 genes was analyzed. The main genes used to estimate the European contribution will *FY*, *SB19.3* and *APOA1*. As for the Amerindian be *PV92* and *CKM*. And lastly, for the African, *AT3*, *LPL* and *MID575*. These markers will be analyzed in terms of the biological role, and not for your paper ancestry marker alone. Given this context, we will study the frequency of AIMs individually and check if the frequency of its alleles have any association with the clinical characteristics of MS, as some of these genes have immune function.

Keywords: Multiple sclerosis. ancestry informative markers. demyelinating.

## Capítulo I

## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é a principal doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), com idade de início entre 20 e 40 anos, acometendo, predominantemente, mulheres caucasianas<sup>1,2</sup>. A doença possui pior prognóstico nos negros, nos homens e nos pacientes que apresentam idade de início superior aos 40 anos de idade<sup>3</sup>.

A EM manifesta-se predominantemente na forma de surto-remissão, condição que o paciente apresenta sintomas neurológicos focais de instalação subaguda, seguido de período de estabilização e resolução dos sintomas, espontaneamente ou após tratamento<sup>4</sup>. O período entre dois episódios de manifestações neurológicas (surto) é denominado remissão. Face à recorrência dos surtos, há um acúmulo de déficits neurológicos, ao longo do tempo<sup>5</sup>. Essas incapacidades são registradas por meio da escala de incapacidade EDSS (derivado do inglês *Expanded Disability Status Scale*), que compreende valores de 0 a 10, sendo 0 a melhor condição do paciente e 10, o óbito<sup>6</sup>. Pacientes afrodescendentes alcançam escores de incapacidade funcional mais precoce que os caucasianos e a gravidade inicial dos surtos é leve<sup>7,8</sup>.

A etiologia da EM não é conhecida. Estudo populacional de EM com gêmeos evidenciou 25% concordância entre gêmeos monozigóticos, 2,3% entre gêmeos dizigóticos e 1,9% entre consanguíneos não gêmeos<sup>9</sup> o que reforça a contribuição de fatores genéticos. Adicionalmente, fatores ambientais como infecções virais e deficiência de vitamina D também são fortes candidatos<sup>10</sup>. Considera-se que fatores ambientais e genéticos interagem e contribuem para desenvolvimento da doença<sup>11</sup>. Comorbidades como dislipidemias contribuem para a progressão da EM<sup>12</sup>.

Há mais de 40 anos, vêm sendo acumuladas informações de marcadores genéticos associados à EM. Grupos de alelos *HLA-DRB1* têm sido primariamente associados, embora publicações implicando os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DQ* sejam relatadas<sup>13</sup>. O grupo de alelos *HLA-DRB1\*15* é o principal fator de risco para EM nos brasileiros, norte-americanos, europeus e asiáticos<sup>13-16</sup>. A presença do grupo de alelo *HLA-DRB1\*11* ou a ausência do *HLA-A\*02:01* são considerados fatores de proteção ou resistência ao desenvolvimento de EM. Atualmente, com o refinamento da técnica genômica

utilizando pesquisa de marcadores genéticos em grande escala, com grande amostra populacional, mais de uma centena de genes já foram associados com EM, sendo muitos desses genes relacionados com o controle da resposta imune (Figura 1)<sup>17</sup>.

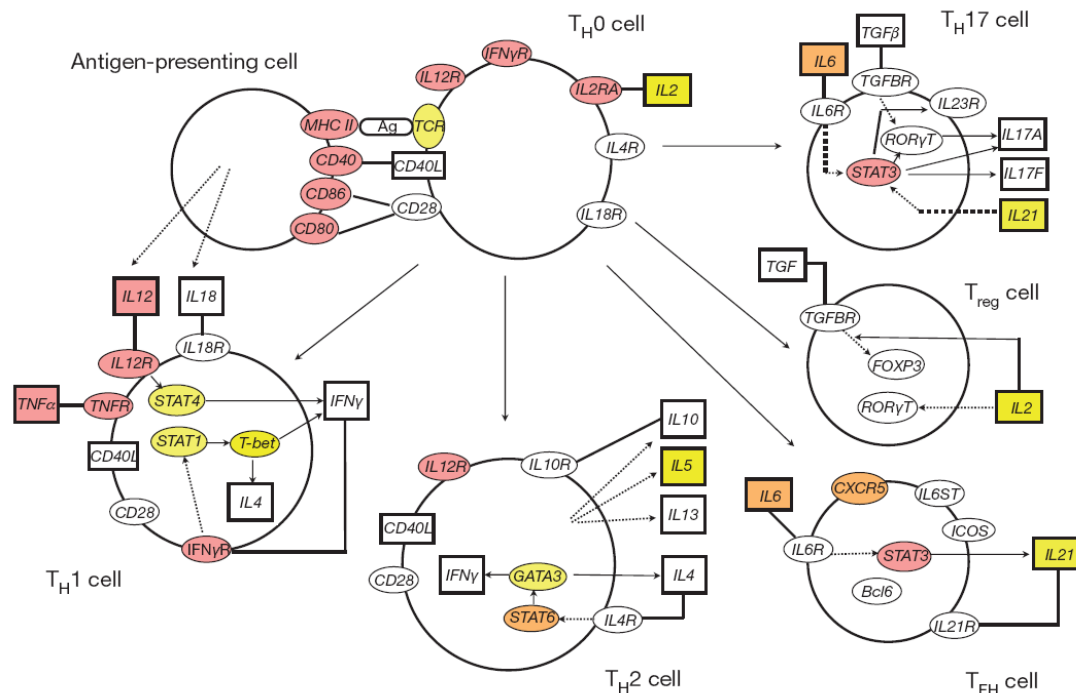


Figura 1. Genes envolvidos na via de diferenciação do linfócito Thelper, nas doenças inflamatórias desmielinizantes.

A EM manifesta-se em diferentes grupos populacionais e em todos os continentes, porém com diferentes taxas de prevalência e risco (Figura 2)<sup>18</sup>. Na cidade de São Paulo (Sudeste do Brasil), a prevalência da EM foi estimada em 15/100.000<sup>19</sup> e no Recife (Nordeste do Brasil) foi estimada em 1,3/100.000 habitantes<sup>20</sup>. Nos países europeus com fluxos migratórios para o Brasil, como a Itália e a Espanha, a prevalência de EM é maior do que a observada em algumas regiões brasileiras<sup>21,22</sup>.

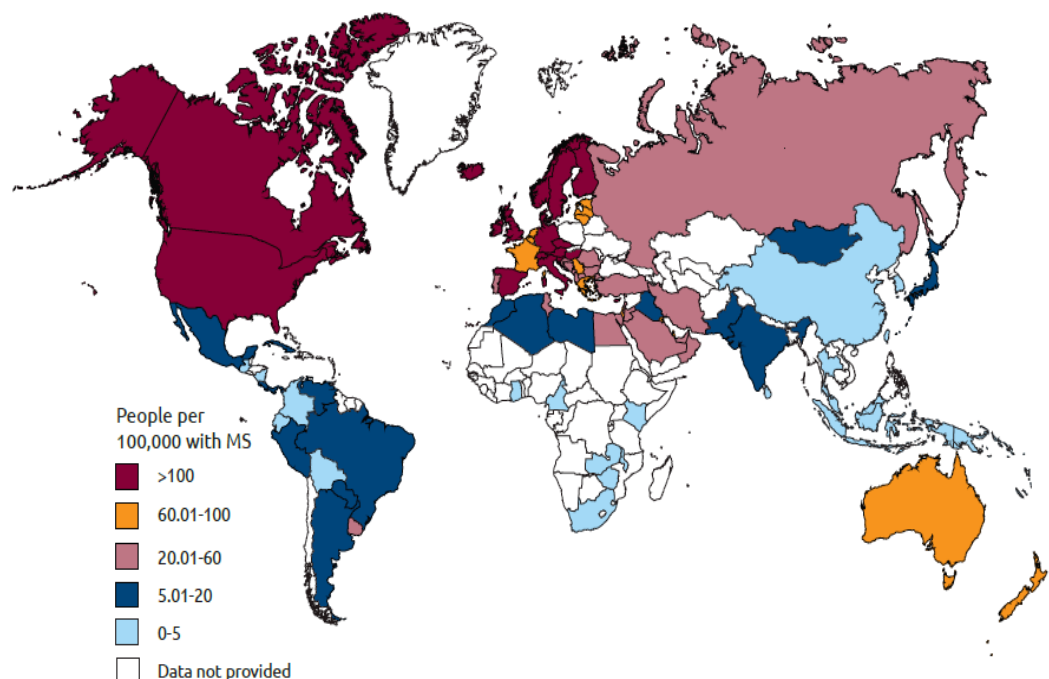


Figura 2. Prevalência mundial da esclerose múltipla por país (2013)<sup>18</sup>.

O Brasil tem fatores étnicos e genéticos diferentes daqueles observados onde a maioria dos estudos genéticos tem sido conduzidos, principalmente Europa e América do Norte. De acordo com o censo nacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 42,6% dos brasileiros se autoidentificam com ancestralidade mista<sup>23</sup>. A população brasileira representa cinco séculos de intercruzamento étnico de indivíduos procedentes dos três continentes, incluindo africanos, caucasianos e nativos americanos. Essa diversidade genética é singular e cria um terreno único que pode influenciar a epidemiologia, a gravidade dos surtos, a idade de início e a resposta ao tratamento na EM.

Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo<sup>24</sup>, a contribuição genética da população europeia, africana e ameríndia em pacientes com EM foi estimada utilizando um painel de 12 genes marcadores informativos de ancestralidade, AIM derivado do inglês *Ancestry informative markers* (Tabela 1\_Anexos). Nesse, os principais genes utilizados foram: i) para estimar a contribuição europeia *FY-null*, *SB19.3* e *APOA1*; ii) contribuição ameríndia, os genes *PV92* e *CKM*, e iii) contribuição africana, os genes *AT3*, *LPL* e *MID575*<sup>24-27</sup>. Na Figura 3, apresentamos a frequência alélica de cada AIMs nas populações

africanas, europeias e ameríndias<sup>24</sup>.

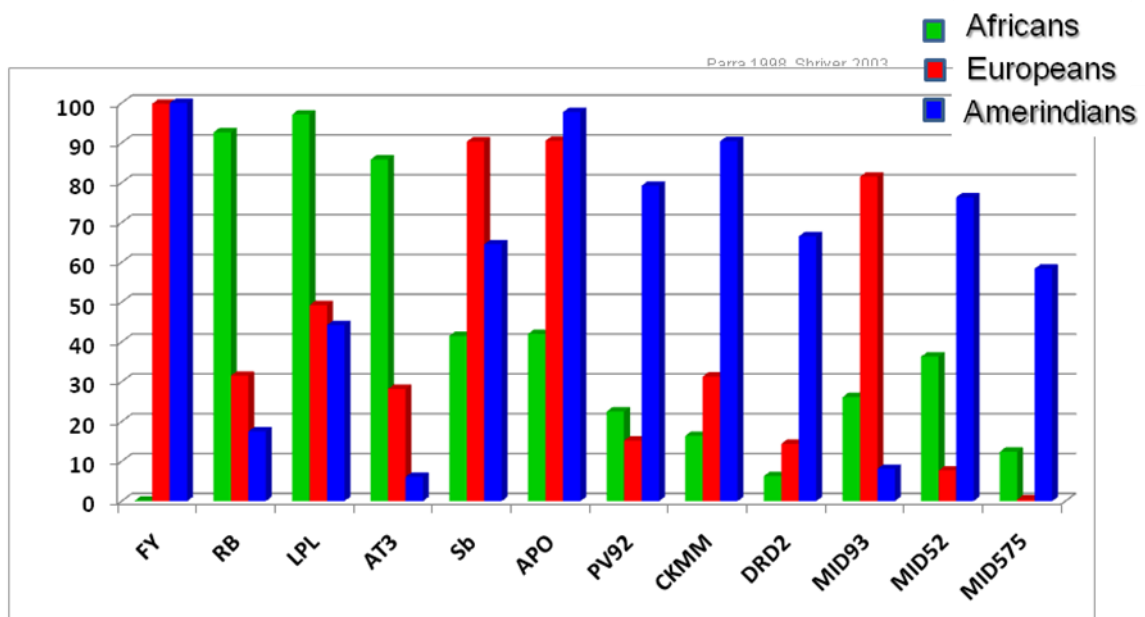


Figura 3. Frequências alélicas de 12 *ancestry informative markers* (AIMs) em europeus, africanos e ameríndios e a frequência alélica diferencial entre essas populações ancestrais

*Considerando que três grupos foram obtidos sem qualquer superposição, o painel de 12 AIMs foi suficiente para adequada discriminação entre as populações parentais: cada uma das populações se agrupou em um dos vértices do triângulo. Os haplótipos de europeus, africanos e ameríndios foram cedidos pelo Dr. Mark Shriver<sup>28</sup>.*

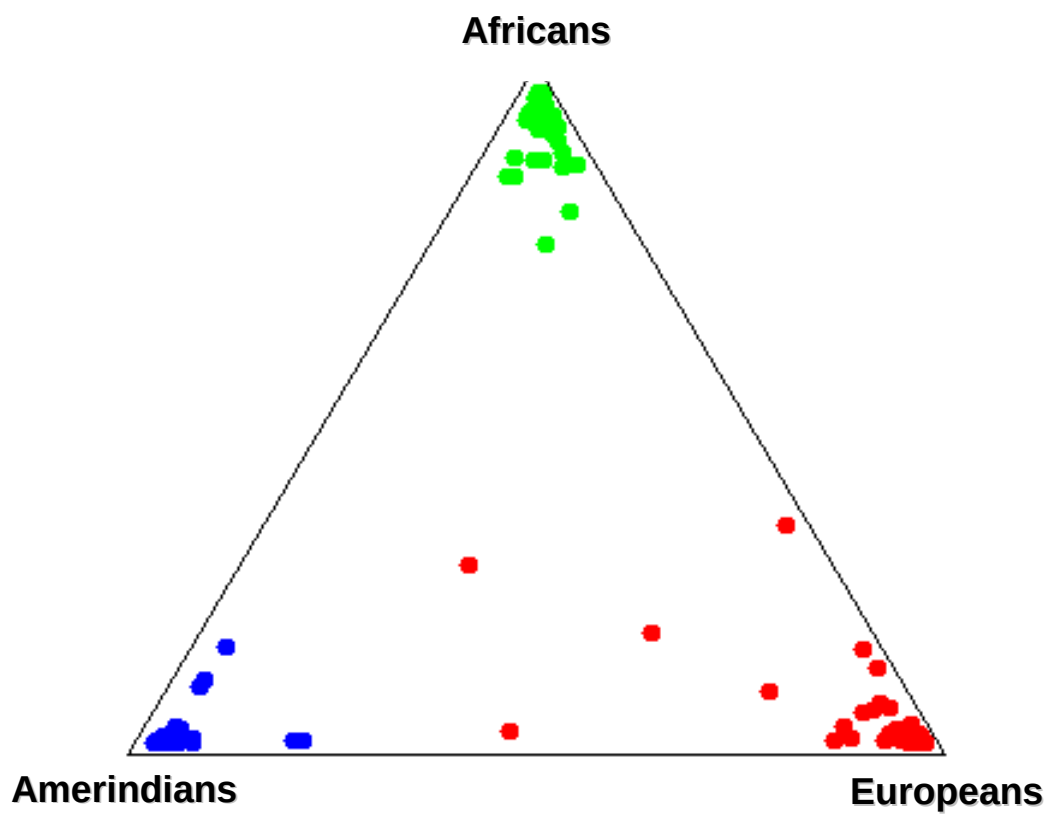
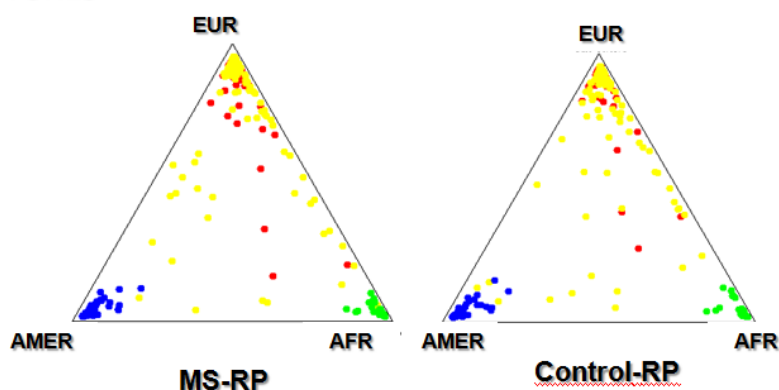


Figura 4. Validação dos 12 AIMs componentes do painel na distinção das populações ancestrais europeia, africana e ameríndias por haplótipos cedidos por Mark Shriver.

**Estimativa de ancestralidade individual pelo software STRUCTURES**



**Estimativa de ancestralidade nos grupos de pacientes com EM e controles**

|            | MS-RP             | Control-RP        |
|------------|-------------------|-------------------|
| Europeus   | $0.785 \pm 0.002$ | $0.704 \pm 0.012$ |
| Africanos  | $0.125 \pm 0.001$ | $0.179 \pm 0.007$ |
| Ameríndios | $0.090 \pm 0.001$ | $0.117 \pm 0.009$ |
|            | $R^2 = 0.999986$  | $R^2 = 0.999238$  |

10

Figura 5. Estimativa de ancestralidade individual e por grupo de pacientes com EM e controles.

Os achados desse estudo evidenciaram que a contribuição europeia predomina na EM, seguida da africana e ameríndia, similar ao que ocorre na população da região Sudeste do Brasil. Em populações estruturadas como a brasileira, os genes *AIMs* são importantes para evitar associações espúrias nos estudos genéticos do tipo caso-controle<sup>29</sup>. Uma aplicação potencial desses genes nas doenças com risco étnico-genético, como ocorre na EM, é verificar a associação com a chance de desenvolver a doença e de contribuir com as variáveis clínicas e laboratoriais. A seguir, apresentamos características dos *AIMs* que foram analisados.

## 1.1. Marcadores informativos de ancestralidade

A seguir, resumiremos algumas características dos principais AIMS componentes do painel proposto no estudo prévio<sup>24</sup> e suas respectivas localizações cromossômicas e funções biológicas. Os AIMS *MID-52*, *MID-93*, *MID-575*, *SB19.3*, *PV92*, *CKM* estão apresentados somente nas tabelas 3 e 4. (Anexos).

### 1.1.1 Gene *FY*

O gene *FY* é também chamado *ACKR1*, *Dfy*, *GPD*, *DARC*, *GpFy*, *CCBP1*, *CD234*, *WBCQ1*. Está localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q23.2) e codifica a glicoproteína de membrana DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*)<sup>30</sup>. A glicoproteína DARC é expressa nos eritrócitos, células endoteliais dos capilares e das vênulas pós-capilares, nos ductos coletores renais, alvéolos pulmonares e nas células de Purkinje do cerebelo<sup>31,32</sup>. Possui função conhecida como receptor de quimiocinas e de parasitas<sup>33</sup>. Como receptor promíscuo de quimiocinas, DARC liga-se às quimiocinas CXC (IL-8, mgSA)<sup>34</sup> e CC (RANTES, CCL5, MCP-1), sugerindo papel nas reações inflamatórias<sup>35</sup>. Em adição, DARC serve como receptor eritrocitário para o parasita da malária humana *Plasmodium vivax*<sup>36</sup>.

Polimorfismos neste gene são a base do sistema sanguíneo Duffy<sup>37</sup>. Os alelos *FYA* e *FYB* e os respectivos antígenos  $FY^a$  e  $FY^b$ , que se diferenciam por 1 aminoácido. O antígeno  $FY^a$  é definido por uma glicina na posição 42 e o antígeno  $FY^b$ , pelo ácido aspártico<sup>37,38</sup>. Já o mais estudado sítio polimórfico ocorre devido a uma mutação pontual no nucleotídeo 125, que muda uma única base 125 G > A<sup>39</sup>. No que diz respeito ao fenótipo, o mais comum entre os indivíduos negros (afro-americanos ou africanos ocidentais) é a ausência da expressão de DARC, o  $Fy(a-b-)$ . No alelo *FYB*, a mutação ocorre na região promotora (GATA box). O polimorfismo – 33 T > C resultará na interrupção do sítio de ligação do fator de transcrição GATA1, impedindo a expressão nos eritrócitos<sup>37</sup>. Entretanto, a expressão nas células endoteliais das vênulas pós capilares e dos sinusóides esplênicos a expressão do gene se mantém<sup>32</sup>,

assim como na barreira hematoencefálica (BHE)<sup>40</sup>. Os indivíduos apresentando eritrócitos DARC negativos também são denominados *FY-null*, tendo sido a condição de homozigose para *FY-null* (rs2814778) associada à neutrofilia nos afrodescendentes<sup>41</sup>. O *FY-null* apresenta distribuição diferenciada em diversas regiões do mundo<sup>42</sup> (Figura 6).

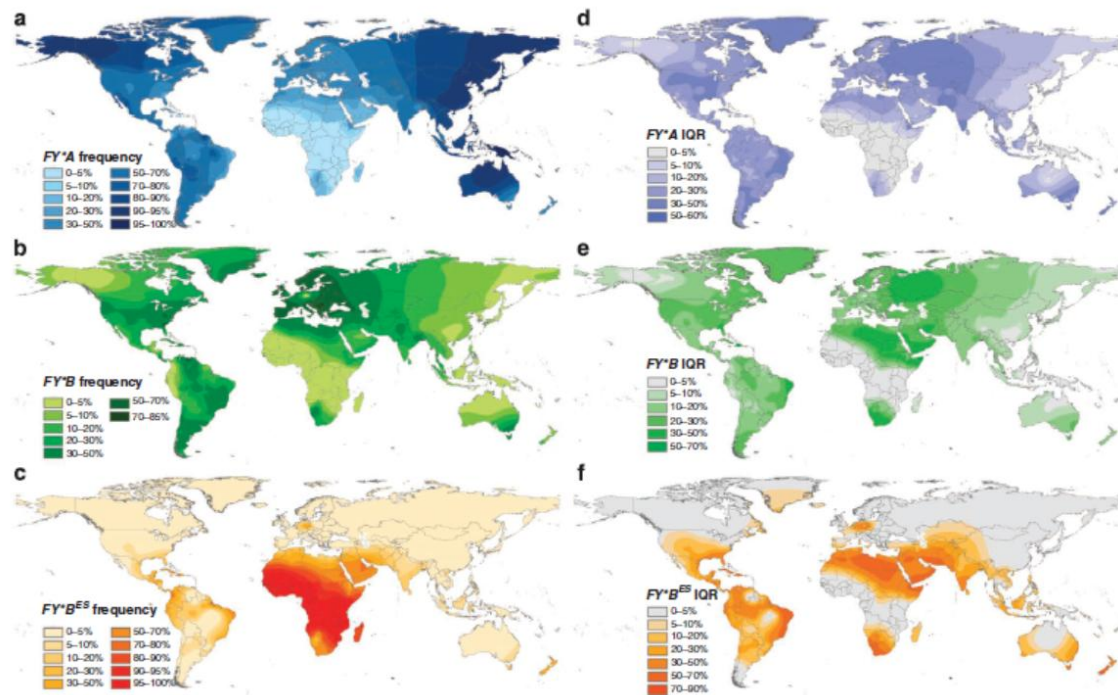


Figura 6 - Mapa da distribuição mundial dos alelos do gene *FY*<sup>42</sup>

### 1.1.2 Gene *AT3*

O gene *AT3*, também conhecido como *AT3D*, *ATIII*, *SERPINC1* e *THPH7*, codifica a proteína inibidora de protease plasmática que é membro da superfamília das serpinas. Essa proteína inibe a trombina como também outras proteases séricas ativadoras do sistema de coagulação. Assim, participa do processo de regulação da cascata da coagulação. Mais de 120 mutações têm sido identificadas nesse gene, sendo muitas dessas conhecidas como causa da deficiência da antitrombina- III<sup>43</sup>. Os polimorfismos descritos no gene *AT3* relacionam-se com discrasias sanguíneas, principalmente a susceptibilidade à trombose. Em paciente com infarto agudo do miocárdio e extensa doença arterial coronariana foi identificada a heterozigossidade da arginina para a

serina, na posição 47. Trombose venosa profunda foi associada a mutação de guanina por citocina, no exon 6 , gerando a troca do aminoácido alanina por prolina, na posição 384<sup>44</sup>. Em um paciente portador de infarto cerebral recorrente, foi descrita mutação de timina por citosina, no exon 3, gerando a troca de prolina por serina, na posição 116<sup>45</sup>. Hemorragia cerebral profunda, seguida de trombose de seio venoso também foram associados à mutação no gene AT3<sup>46</sup>.

### **1.1.3 Gene *LPL***

O gene *LPL*, também conhecido como *LIPD* e *HDLCQ11*, codifica a enzima lipase lipoproteica que apresenta expressão no coração, músculo e no tecido adiposo. Sua função está relacionada com hidrólise de moléculas de triglicérides integrantes das partículas lipoproteicas. Triglicérides e apolipoproteína C promovem estímulo e inibição da atividade enzimática da *LPL*, respectivamente<sup>47</sup>. Dezenas de mutações estão relacionadas às desordens no metabolismo lipoproteico<sup>48-54</sup>, Hipertrigliceremia familiar e esporádica tem correlação com doenças coronárias e aumento de risco para infarto do miocárdio<sup>55, 56</sup>. Interessantemente, marcadores sorológicos inflamatórios estão relacionados com doença coronariana na população geral<sup>57</sup>. Adicionalmente, redução significativa da atividade enzimática da *LPL* pelas citocinas TNF, IL-1 e interferon gama tem sido descrita<sup>58-60</sup>. *LPL* evidenciou ser um regulador positivo da ativação mediada pelo receptor da célula T, *in vitro* e *in vivo*, por meio de efeitos na ligação ao receptor de célula T induzida por rearranjo da actina. Adicionalmente, alta atividade lipolítica plasmática foi observada em pacientes com EM. Níveis elevados de triglicérides, colesterol e LDL estão associados com progressão na EM e as duas últimas condições também apresentam associação com atrofia cerebral e com maior acúmulo de lesões na ponderação T2 na ressonância magnética (RM)s<sup>12</sup>. Determinados alelos estão associados com níveis dislipidêmicos na população africana<sup>61</sup>.

#### 1.1.4 Gene *APOA1*

Este gene codifica a apolipoproteína A-I (apo A-I), que é o principal componente da lipoproteína de alta densidade (derivado do inglês *High Density Lipoprotein-HDL*) no plasma. Essa proteína promove o efluxo do colesterol dos tecidos para o fígado, para excreção. Defeitos neste gene estão associados à amiloidose sistêmica<sup>62</sup>. No contexto da autoimunidade, estudos sugerem possível papel da apolipoproteína, codificada pelo gene *APOA1*, na inflamação. Tem sido atribuída à apolipoproteína A-I ligada ao HDL papel anti-inflamatório. Esta proteína inibe a ativação dos monócitos por meio da ligação às células T estimuladas no sítio da inflamação. Isso acarreta diminuição da produção do TNF e da interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) pelos monócitos, como mostrado na Figura 7<sup>60</sup>.

Figura 7. Modo de ação da apoA-I

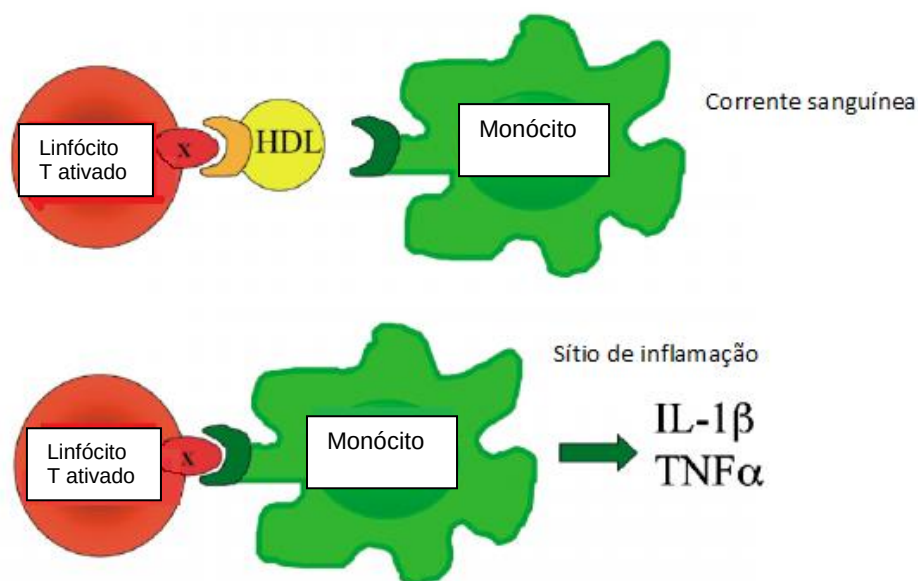


Figura 7. Modo de ação da apo A-I: Em condições normais, o nível de HDL no sangue é suficiente para inibir a liberação de citocinas pelos monócitos, mediado pelo contato celular direto com linfócitos T estimulados. Associada ao HDL, a apo A-I liga-se ao fator X na superfície de linfócitos T que impede a ligação deste último ao seu receptor nos monócitos, inibindo, assim, a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Adaptado de Burger *et al.*, 2002)<sup>60</sup>

### 1.1.5 Gene *DRD2*

A dopamina pode se ligar a 2 classes de receptores dopaminérgicos, D1 - receptores, D1 e D5; e D2 (D2, D3, D4). O grupo de receptores D1 possuem atividade estimulatória e o grupo D2 (D2, D3 e D4) inibitória. Os receptores D2 da dopamina são expressos nos neurônios dopaminérgicos do SNC e em células do sistema imune. No SNC quando estimulados apresentam atividade inibitória diminuindo os níveis de AMPc e cálcio intracelular resultando em hiperpolarização da célula. Adicionalmente, foi observada a expressão de receptores D2 da dopamina também em linfócito, célula do sistema imune<sup>63</sup>.

Estudos utilizando cultura de clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, foi sugerido que a DA é tanto sintetizada como armazenada nos linfócitos. Isso foi possível a partir do aumento de catecolaminas evidenciado nas células estimuladas com precursor da DA<sup>64</sup>. Estudos experimentais com agonista ou antagonista dos receptores de dopamina, grupo D1 e D2, parecem influenciar diferencialmente no desenvolvimento da EAE<sup>65</sup>, contribuindo para ou protegendo do desenvolvimento dos sintomas<sup>66-69</sup>. Cada receptor é codificado por um gene. O gene *DRD2*, também conhecido como *D2R*, *D2* codifica o subtipo D2 do receptor de dopamina. Polimorfismos do gene *DRD2* gene têm sido associadas com esquizofrenia<sup>70,71</sup> e com distonia mioclônica<sup>72</sup>. Interessantemente, alterações do sistema imune são observadas na esquizofrenia<sup>63</sup>. O SNP (derivado do inglês *single nucleotide polymorphisms*) *DRD2-BclI* apresenta associação com agressividade infantil<sup>73</sup> e ganho de peso induzida pelo uso de droga anti-psicótica<sup>74</sup>.

### 1.1.6 Gene *RB*

O gene *RB*, também conhecido como *pRb*, *OSRC*, *pp110*, *p105-Rb* e *PPP1R130*, foi o primeiro gene supressor tumoral descoberto. Ele codifica a proteína que regula de forma negativa o ciclo celular e estabiliza a heterocromatina. A forma ativa da proteína liga-se ao fator de transcrição E2F1<sup>75</sup>. Defeitos neste gene são causadores de câncer de bexiga<sup>76</sup> e sarcoosteogênico<sup>77</sup>. Adicionalmente, ocorre associação entre os polimorfismos

no gene *RB* e retinoblastoma nas crianças. O fenótipo apresenta-se unilateral quando há mutação nas duas primeiras bases do íntron, após o éxon 19, ocorrendo a troca GT por GC. Já para a manifestação bilateral, pode haver mutação no éxon 14 (posição 1462), em que a troca de citosina por timina, gera a mudança do aminoácido arginina por treonina<sup>78</sup>.

A revisão da literatura dos genes que compõem o painel de *AIMs* sugere que além de caracterizar população específica, determinados SNPs possuem papel biológico relacionados à inflamação e neoplasia, particularmente, o *FY-null*, o *APOA1* e o *LPL*.

Tabela 2. Características gerais dos genes marcadores de ancestralidade

| Marcador                       | Gene                                        | Aliases                                              | Posição genética (cromossomo) |
|--------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>FY-null (rs2814778)</i>     | Receptor atípico de quimiocinas             | ACKR1, CCBP1, CD234, DARC, Dfy, FY, GPD, GpFy, WBCQ1 | 1q23.2                        |
| <i>RB1(rs2252544)</i>          | Retinoblastoma 1                            | RB; pRb; OSRC; pp110; p105-Rb; PPP1R130              | 13q14.2                       |
| <i>LPL (rs285)</i>             | Lipase lipoproteica                         | LIPD, HDLCQ11                                        | 8p21.3                        |
| <i>AT3 (rs3138521)</i>         | Inibidor serpin da peptidase _ antitrombina | SERPINC1, AT3D, ATIII, THPH7                         | 1q25.1                        |
| <i>APOA1 (rs3138522)</i>       | Apolipoproteína A                           | Indisponível                                         | 11q23.3                       |
| <i>PV92 (rs3138523)</i>        | indisponível                                | Indisponível                                         | 16q24.1                       |
| <i>CKM (rs4884)</i>            | Creatinocinase muscular                     | Indisponível                                         | 19q13.32                      |
| <i>DRD2-BclI (rs1079598)</i>   | Receptor de dopamina_D2                     | D2R, D2DR                                            | 11q23.1                       |
| <i>MID-52 (rs16344)</i>        | indisponível                                | Indisponível                                         | 4q24                          |
| <i>MID-575 (rs140864) AGO3</i> | Argonauta 3                                 | EIF2C3                                               | 1p34.3                        |
| <i>MID-93(rs16383) XRCC6</i>   | Reparo por raio-x de células defeituosas    | ML8, KU70, TLAA, CTC75, CTCBF, G22P1                 | 22q13.2                       |
| <i>SB19.3 (rs3138524)</i>      | indisponível                                | Indisponível                                         | 19p13.11                      |

Considerando que a EM apresenta fator de risco étnico e genético na frequência de manifestação da doença e sua gravidade, e a população brasileira apresenta contribuição de populações ancestrais ameríndia, europeia e africanaé relevante o estudo da possível associação de genes populações específicas e aspectos epidemiológicos e clínicos da EM no Brasil.Portanto, nesse estudo, os *AIMs* serão analisados além do seu papel de marcadores de ancestralidade.

## **2.OBJETIVOS**

### Geral:

Associar a variabilidade genética de um painel de doze AIMS com aspectos demográficos e clínicos observados em pacientes com EM da região Noroeste do Estado de São Paulo.

### Específicos:

1. Verificar se há associação dos marcadores de ancestralidade em relação à idade de início e gravidade do primeiro surto na EM, surtos leves ( $EDSS \leq 2,5$ ) e surtos graves ( $EDSS \geq 5$ )
2. Analisar a frequência dos genótipos do painel de marcadores de ancestralidade (europeia, africana, ameríndia) em pacientes com EM e controles

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Pacientes e Controles

Este estudo é subprojeto de projeto maior aprovado sob o protocolo **nº4205-2012** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo. Participaram da pesquisa, 131 pacientes com EM, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, diagnosticados segundo os critérios de McDonald<sup>79</sup> e 131 doadores de medula óssea do Hemocentro de Ribeirão Preto, sem história pessoal ou familiar de doença autoimune ou desmielinizante. No estudo atual, ao grupo de 128 pacientes com EM foram acrescentados 3 pacientes e aos 108 controles foram acrescentados 20 indivíduos saudáveis.

Em estudo prévio, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, com os pacientes acima selecionados foram pesquisados 12 *AIMs* com valores de  $\delta > 50\%$  entre africanos e europeus ou ameríndios<sup>25</sup> e com  $\delta > 50\%$  entre ameríndios e africanos ou europeus<sup>26,27</sup>.

Para a detecção dos *AIMs* foi utilizada a técnica de PCR-RFLP<sup>80</sup> (reação em cadeia de Polimerase- polimorfismo de fragmentos de restrição).

### 3.2 Análise estatística

Para comparar as frequências alélicas entre pacientes com EM estratificados quanto à idade de início e a gravidade do primeiro surto foram construídas tabelas de contingência 2 x 2 e o valor de *P* foi calculado através do teste exato de Fisher com *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95%, pelo *software* GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Adicionalmente, análise de regressão logística pelo *software* SAS foi realizada para os grupos de pacientes com EM estratificados quanto a faixa etária e gravidade do surto.

Estimativa de mistura individual a partir da obtenção de índice de ancestralidade africanas (IAA) para os indivíduos do grupo de pacientes e de controles havia sido realizada. Uma vez que a comparação entre a mediana dos IAA (Kruskal-Wallis) pelos testes de comparações múltiplas de *Dunn* pelo *software* *GraphPad* evidenciaram similaridade entre os grupos de pacientes com EM e controles, esses grupos puderam ser comparados, destarte para avaliar a função biológica dos AIMS e suas associações quanto à idade de início dos sintomas e na gravidade do primeiro surto da doença.

#### 4.RESULTADOS

Trinta e seis homens e 67 mulheres foram avaliados(2,1:1). A mediana da idade de início da doença foi de 30 anos (intervalo de 13 a 59 anos) e a mediana da escala expandida do estado de incapacidade, EDSS,no primeiro surto foi de 2,5 (intervalo de 1,0 a 8,5). A mediana de tempo de evolução da doença foi de 7 anos (intervalo de 0 a 31 anos),e a mediana da escala EDSS na última avaliação foi de 6,0 (intervalo de 1,0 a 10) (Tabela 5).

Tabela 5. Aspectos clínicos e demográficos de pacientes com esclerose múltipla da região noroeste do Estado de São Paulo.

| Variáveis                          | EM            |
|------------------------------------|---------------|
| Razão p/sexo (F/M)                 | 2,1:1         |
| Idade de início, anos (mediana)    | 30 (13-59)    |
| Gravidade do 1º surto (mediana)    | 2,5 (1,0-8,5) |
| Tempo de evolução, anos (mediana)  | 7,0 (0-31)    |
| EDSS na última avaliação (mediana) | 6,0 (1,0-10)  |

A análise do painel dos *AIMs* evidenciou que a frequência de heterozigose foi menor para os polimorfismos *FY-null A/G(rs2814778)* e *AT3 ins/del (rs138521)* no grupo de pacientes com EM do que na população controle (p 0,01 OR 0,44 IC 0,24- 0,82 e p 0,004, OR=0,44 IC 0,25- 0,77, respectivamente), como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Análise entre marcadores de ancestralidade e chance de diagnóstico de esclerose múltipla e controles.

| <b>Marcador de ancestralidade</b> | <b>B</b> | <b>ep</b> | <b>Wald</b> | <b>p</b> | <b>OR</b> | <b>IC (OR;95%)</b> |      |
|-----------------------------------|----------|-----------|-------------|----------|-----------|--------------------|------|
| Heterozigoto em <i>FY-null</i>    | -0,81    | 0,32      | 6,63        | 0,010    | 0,44      | 0,24               | 0,82 |
| Heterozigoto em <i>RB</i>         | 0,01     | 0,28      | 0,00        | 0,962    | 1,01      | 0,58               | 1,77 |
| Heterozigoto em <i>LPL</i>        | 0,08     | 0,28      | 0,09        | 0,766    | 1,09      | 0,63               | 1,89 |
| Heterozigoto em <i>AT3</i>        | -0,82    | 0,28      | 8,39        | 0,004    | 0,44      | 0,25               | 0,77 |
| Heterozigoto em <i>SB19.3</i>     | -0,58    | 0,38      | 2,41        | 0,120    | 0,56      | 0,27               | 1,17 |
| Heterozigoto em <i>APOA1</i>      | 0,25     | 0,40      | 0,38        | 0,535    | 1,28      | 0,59               | 2,78 |
| Heterozigoto em <i>PV92</i>       | -0,38    | 0,29      | 1,70        | 0,193    | 0,69      | 0,39               | 1,21 |
| Heterozigoto em <i>CKM</i>        | -0,38    | 0,29      | 1,69        | 0,194    | 0,69      | 0,39               | 1,21 |
| Heterozigoto em <i>DRD2</i>       | 0,18     | 0,34      | 0,27        | 0,601    | 1,19      | 0,62               | 2,32 |
| Heterozigoto em <i>MID-93</i>     | 0,27     | 0,29      | 0,87        | 0,351    | 1,31      | 0,74               | 2,31 |
| Heterozigoto em <i>MID-52</i>     | -0,32    | 0,31      | 1,09        | 0,296    | 0,72      | 0,39               | 1,33 |
| Heterozigoto em <i>MID-575</i>    | -0,33    | 0,42      | 0,59        | 0,443    | 0,72      | 0,31               | 1,66 |
| Constante                         | 1,07     | 0,38      | 7,89        | 0,005    | 2,90      |                    |      |

As frequências alélicas e genotípicas dos *AIMs* que compõem o painel e sua distribuição em relação à idade de início da EM, estratificada em <20 e ≥20 anos, são apresentadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Os alelos *LPL T* (*rs285*) e o *APOA1 Ins* (*rs3138522*) apresentaram maior frequência no grupo de pacientes com mais de 20 anos, ( $P=0,04$  OR 2,18 IC 1,01-4,73 e  $P=0,007$  OR=0,29 e IC 0,12-0,66,respectivamente) em relação ao grupo de pacientes com idade de início ≤20 anos. As frequências alélicas dos demais marcadores não apresentaram significância estatística (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e idade de início da esclerose múltipla

| Marcadores                 | < 20<br>(2N= 262) | ≥ 20<br>(2N= 262) | p             | OR          | IC               | Marcadores                       | < 20<br>(2N= 262) | ≥ 20<br>(2N= 262) | p              | OR          | IC               |
|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------|------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|-------------|------------------|
| <b>FY- null(rs2814778)</b> |                   |                   |               |             |                  | <b>APOA1 (rs3138522)</b>         |                   |                   |                |             |                  |
| A                          | 31                | 189               | 0,22          | 2,27        | 0,66-7,77        | I                                | 23                | 202               | <b>0,007**</b> | <b>0,29</b> | <b>0,12-0,66</b> |
| G                          | 3                 | 39                |               |             |                  | D                                | 11                | 26                |                |             |                  |
| <b>AT3 (rs3138521)</b>     |                   |                   |               |             |                  | <b>MID-52 (rs16344)</b>          |                   |                   |                |             |                  |
| I                          | 8                 | 75                | 0,44          | 0,68        | 0,30-1,51        | I                                | 7                 | 40                | 0,81           | 1,13        | 0,46-2,77        |
| D                          | 26                | 153               |               |             |                  | D                                | 27                | 188               |                |             |                  |
| <b>SB19.3 (rs3138524)</b>  |                   |                   |               |             |                  | <b>MID-575 (rs140864)</b>        |                   |                   |                |             |                  |
| I                          | 29                | 175               | 0,51          | 1,51        | 0,59-3,83        | I                                | 0                 | 21                | 0,08           | 0,13        | 0,01-2,23        |
| D                          | 5                 | 53                |               |             |                  | D                                | 34                | 207               |                |             |                  |
| <b>PV92 (rs3138523)</b>    |                   |                   |               |             |                  | <b>MID-93(rs16383)</b>           |                   |                   |                |             |                  |
| I                          | 10                | 55                | 0,53          | 1,3         | 0,60-2,82        | I                                | 22                | 153               | 1              | 0,98        | 0,46-2,06        |
| D                          | 24                | 163               |               |             |                  | D                                | 12                | 75                |                |             |                  |
| <b>LPL (rs285)</b>         |                   |                   |               |             |                  | <b>DRD2-<br/>BclI(rs1079598)</b> |                   |                   |                |             |                  |
| T                          | 25                | 124               | <b>0,04**</b> | <b>2,18</b> | <b>1,01-4,73</b> | T                                | 6                 | 38                | 1              | 1           | 0,38-2,56        |
| C                          | 9                 | 104               |               |             |                  | C                                | 28                | 190               |                |             |                  |
| <b>RB1 (rs2252544)</b>     |                   |                   |               |             |                  | <b>CKM(rs4884)</b>               |                   |                   |                |             |                  |
| T                          | 20                | 138               | 0,58          | 0,81        | 0,40-1,65        | T                                | 8                 | 72                | 0,33           | 0,61        | 0,26-1,42        |
| C                          | 14                | 90                |               |             |                  | C                                | 26                | 156               |                |             |                  |

Adicionalmente, a frequência do genótipo *APOA1Del/Del* (*rs3138522*) no grupo de pacientes com idade de início inferior a 20 anos de idade ( $P=0,003$ ; *OR* 16 e *IC* 2,68-95,49) foi mais elevada que no grupo de pacientes com idade de início maior que 20 anos (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e idade de início, por faixa etária, na esclerose múltipla.

| Marcador                          | <20 | ≥ 20 | P    | OR   | IC        | Marcador                            | <20      | ≥ 20     | P              | OR        | IC                |
|-----------------------------------|-----|------|------|------|-----------|-------------------------------------|----------|----------|----------------|-----------|-------------------|
| <b><i>FY-null (rs2814778)</i></b> |     |      |      |      |           | <b><i>APOA1 (rs3138522)</i></b>     |          |          |                |           |                   |
| AA                                | 14  | 82   | 0,39 | 1,95 | 0,52-7,19 | II                                  | 10       | 90       | 0,13           | 0,41      | 0,14-1,19         |
| AG                                | 3   | 25   | 0,76 | 0,71 | 0,19-2,65 | ID                                  | 3        | 22       | 1              | 0,83      | 0,22-3,14         |
| GG                                | 0   | 7    | 0,59 | 0,38 | 0,02-7,08 | DD                                  | <b>4</b> | <b>2</b> | <b>0,003**</b> | <b>16</b> | <b>2,68-95,49</b> |
| <b><i>AT3 (rs3138521)</i></b>     |     |      |      |      |           | <b><i>MID-52 (rs16344)</i></b>      |          |          |                |           |                   |
| II                                | 1   | 13   | 0,69 | 0,45 | 0,05-3,72 | DD                                  | 11       | 77       | 1              | 0,96      | 0,33-2,76         |
| ID                                | 6   | 49   | 0,8  | 0,84 | 0,30-2,33 | DI                                  | 5        | 34       | 1              | 0,9       | 0,29-2,73         |
| DD                                | 10  | 52   | 0,45 | 1,49 | 0,54-4,05 | II                                  | 1        | 3        | 0,44           | 2,17      | 0,21-22,16        |
| <b><i>SB19.3 (rs3138524)</i></b>  |     |      |      |      |           | <b><i>MID-575 (rs140864)</i></b>    |          |          |                |           |                   |
| II                                | 14  | 80   | 0,58 | 1,48 | 0,45-4,84 | DD                                  | 17       | 93       | 0,07           | 8,5       | 0,49-146,87       |
| ID                                | 1   | 15   | 1    | 0,82 | 0,17-3,95 | DI                                  | 0        | 20       | 0,07           | 0,12      | 0,01-2,15         |
| DD                                | 2   | 19   | 0,73 | 0,62 | 0,13-2,97 | II                                  | 0        | 1        | 1              | 2,04      | 0,08-52,16        |
| <b><i>PV92 (rs3138523)</i></b>    |     |      |      |      |           | <b><i>MID-93 (rs16383)</i></b>      |          |          |                |           |                   |
| II                                | 1   | 12   | 0,69 | 0,47 | 0,05-3,9  | DD                                  | 2        | 11       | 0,69           | 1,17      | 0,23-5,77         |
| ID                                | 8   | 31   | 0,09 | 2,51 | 0,91-6,93 | DI                                  | 8        | 53       | 1              | 0,92      | 0,33-2,50         |
| DD                                | 8   | 66   | 0,2  | 0,52 | 0,19-1,42 | II                                  | 7        | 50       | 1              | 1,02      | 0,37-2,78         |
| <b><i>LPL (rs285)</i></b>         |     |      |      |      |           | <b><i>DRD2-BcII (rs1079598)</i></b> |          |          |                |           |                   |
| TT                                | 9   | 33   | 0,1  | 2,45 | 0,89-6,73 | TT                                  | 0        | 6        | 1              | 0,45      | 0,02-8,35         |
| TC                                | 7   | 58   | 0,8  | 0,77 | 0,28-2,09 | TC                                  | 6        | 26       | 0,37           | 1,69      | 0,57-4,95         |
| CC                                | 1   | 23   | 0,19 | 0,23 | 0,02-1,84 | CC                                  | 11       | 82       | 0,77           | 0,78      | 0,26-2,25         |
| <b><i>RB1 (rs2252544)</i></b>     |     |      |      |      |           | <b><i>CKM (rs4884)</i></b>          |          |          |                |           |                   |
| CC                                | 2   | 20   | 1    | 0,94 | 0,24-3,55 | TT                                  | 0        | 15       | 0,22           | 0,17      | 0,01-3,03         |
| CT                                | 10  | 50   | 0,44 | 1,6  | 0,58-4,35 | TC                                  | 8        | 42       | 0,6            | 1,37      | 0,50-3,74         |
| TT                                | 5   | 44   | 0,44 | 0,61 | 0,20-1,83 | CC                                  | 9        | 57       | 0,8            | 1,25      | 0,45-3,39         |

Adicionalmente, aplicação de regressão logística para grupos com início <20 anos e ≥20 anos evidenciou associação entre o gene *APOA1* e o grupo de pacientes com idade de início <20 anos (Tabela 9), corroborando achado similar ao da análise individual dos alelos do SNP *APOA1*

Tabela 9. Análise de associação entre idade de início, por estatificação, e marcadores de ancestralidade na esclerose múltipla.

| Marcadores                        | P    | OR     | IC        | Marcadores                          | P              | OR           | IC                 |
|-----------------------------------|------|--------|-----------|-------------------------------------|----------------|--------------|--------------------|
| <b><i>FY-null (rs2814778)</i></b> |      |        |           | <b><i>APOA1 (rs3138522)</i></b>     |                |              |                    |
| AA                                | ??   | ??     | ??        | II                                  | 0,06           | 0,36         | 0,12-1,06          |
| AG                                | 0,67 | 0,75   | 0,20-2,83 | ID                                  | 0,92           | 0,93         | 0,24-3,56          |
| GG                                | 0,97 | <0,001 | >999,999  | <b>DD</b>                           | <b>0,001**</b> | <b>17,07</b> | <b>2,84-102,48</b> |
| <b><i>AT3 (rs23138521)</i></b>    |      |        |           | <b><i>MID-52 (rs16344)</i></b>      |                |              |                    |
| II                                | 0,49 | 0,48   | 0,06-3,93 | DD                                  | 0,77           | 0,85         | 0,29-2,50          |
| ID                                | 0,57 | 0,73   | 0,25-2,13 | DI                                  | 0,98           | 1,01         | 0,33-3,09          |
| DD                                | 0,32 | 1,67   | 0,59-4,71 | II                                  | 0,48           | 2,29         | 0,22-23,39         |
| <b><i>SB19.3 (rs3138524)</i></b>  |      |        |           | <b><i>MID-575 (rs140864)</i></b>    |                |              |                    |
| II                                | 0,28 | 2,03   | 0,54-7,54 | DD                                  | 0,96           | >999,99      | <0,001-->999,99    |
| ID                                | 0,4  | 0,4    | 0,05-3,30 | DI                                  | 0,96           | >999,99      | <0,001-->999,99    |
| DD                                | 0,6  | 0,66   | 0,13-3,12 | II                                  | 0,99           | >999,99      | <0,001-->999,99    |
| <b><i>PV92 (rs3138523)</i></b>    |      |        |           | <b><i>MID-93 (rs16383)</i></b>      |                |              |                    |
| II                                | 0,51 | 0,5    | 0,06-4,11 | DD                                  | 0,69           | 1,37         | 0,27-6,88          |
| ID                                | 0,13 | 2,2    | 0,78-6,24 | DI                                  | 0,81           | 0,88         | 0,31-2,48          |
| DD                                | 0,31 | 0,58   | 0,21-1,64 | II                                  | 0,99           | 1            | 0,36-2,79          |
| <b><i>LPL (rs285)</i></b>         |      |        |           | <b><i>DRD2-BclI (rs1079598)</i></b> |                |              |                    |
| TT                                | 0,05 | 2,72   | 0,96-7,67 | TT                                  | 0,97           | <0,001       | >999,99            |
| TC                                | 0,47 | 0,68   | 0,24-1,93 | TC                                  | 0,27           | 1,82         | 0,61-5,41          |
| CC                                | 0,18 | 0,24   | 0,03-1,94 | CC                                  | 0,55           | 0,72         | 0,24-2,12          |
| <b><i>RB1 (rs2252544)</i></b>     |      |        |           | <b><i>CKM (rs4884)</i></b>          |                |              |                    |
| CC                                | 0,54 | 0,62   | 0,13-2,92 | TT                                  | 0,96           | <0,001       | <0,001-->999,99    |
| CT                                | 0,23 | 1,86   | 0,66-5,25 | TC                                  | 0,43           | 1,5          | 0,53-4,19          |
| TT                                | 0,45 | 0,65   | 0,21-1,98 | CC                                  | ??             | ??           | ??                 |

Considerando a gravidade do primeiro surto na EM, foram analisadas as frequências alélicas e genotípicas dos *AIMs* em relação ao EDSS. O grupo de pacientes com EM foi estratificado quanto à gravidade do primeiro surto com corte no EDSS 2,5, sendo  $\leq 2,5$  e  $>2,5$ . O alelo *LPL T (rs285)* apresentou frequência aumentada no grupo de pacientes com EDSS  $\leq 2,5$  ( $P=0,03$ ; OR 1,72 e IC 1,05-2,81). Enquanto o alelo C do *DRD2-BclI C (rs 1079598)*, apresentou frequência aumentada no grupo com EDSS  $>2,5$ , ( $P=0,02$ ; OR 2,3 IC 1,15-4,58) (Tabela 10).

Tabela 10.Frequência alélica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto na esclerose múltipla mensurada pela Escala de EDSS.

| Marcadores genéticos        | ≤ 2,5 | > 2,5 | p             | OR          | IC               | Marcadores genéticos        | ≤ 2,5 | > 2,5 | p             | OR         | IC                |
|-----------------------------|-------|-------|---------------|-------------|------------------|-----------------------------|-------|-------|---------------|------------|-------------------|
| <b>FY- null (rs2814778)</b> |       |       |               |             |                  | <b>APOA1 (rs3138522)</b>    |       |       |               |            |                   |
| A                           | 116   | 104   |               |             |                  | I                           | 122   | 103   |               |            |                   |
| G                           | 20    | 22    | 0,61          | 1,2         | 0,62 - 2,33      | D                           | 14    | 23    | 0,07          | 1,9        | 0,93 - 3,89       |
| <b>AT3 (rs3138521)</b>      |       |       |               |             |                  | <b>MID-52 (rs16344)</b>     |       |       |               |            |                   |
| I                           | 38    | 45    |               |             |                  | I                           | 20    | 27    |               |            |                   |
| D                           | 98    | 81    | 0,18          | 0,69        | 0,41 - 1,16      | D                           | 116   | 99    | 0,19          | 0,64       | 0,34 - 1,21       |
| <b>SB19.3 (rs3138524)</b>   |       |       |               |             |                  | <b>MID-575(rs140864)</b>    |       |       |               |            |                   |
| I                           | 108   | 96    |               |             |                  | I                           | 8     | 13    |               |            |                   |
| D                           | 28    | 30    | 0,55          | 1,23        | 0,69-2,20        | D                           | 128   | 113   | 0,25          | 0,55       | 0,22 - 1,38       |
| <b>PV92 (rs3138523)</b>     |       |       |               |             |                  | <b>MID-93 (rs16383)</b>     |       |       |               |            |                   |
| I                           | 36    | 29    |               |             |                  | I                           | 96    | 83    |               |            |                   |
| D                           | 96    | 91    | 0,66          | 1,15        | 0,65 - 2,01      | D                           | 40    | 43    | 0,5           | 1,21       | 0,72 - 2,04       |
| <b>LPL (rs285)</b>          |       |       |               |             |                  | <b>DRD2-BclI(rs1079598)</b> |       |       |               |            |                   |
| T                           | 86    | 63    |               |             |                  | T                           | 30    | 14    |               |            |                   |
| C                           | 50    | 63    | <b>0,03**</b> | <b>1,72</b> | <b>1,05-2,81</b> | C                           | 106   | 112   | <b>0,02**</b> | <b>2,3</b> | <b>1,15- 4,58</b> |
| <b>RB1 (rs2252544)</b>      |       |       |               |             |                  | <b>CKM (rs4884)</b>         |       |       |               |            |                   |
| T                           | 85    | 73    |               |             |                  | T                           | 36    | 44    |               |            |                   |
| C                           | 51    | 53    | 0,38          | 1,25        | 0,76- 2,05       | C                           | 100   | 82    | 0,18          | 0,68       | 0,40 - 1,16       |

Os genótipos *LPL* T/T (*rs285*) [ $P=0,02$  OR 2,5 IC 1,16-5,37], *APOA1* ins/ins (*rs3138522*) [ $P=0,02$  OR=2,83 IC 1,21-6,62], *MID-52* del/del (*rs16344*) [ $P=0,02$  OR 2,37 IC 1,12-5,01] e *DRD2-BclI* T/T (*rs1079598*) [ $P=0,02$  OR 13,41 IC 0,73-243,37] apresentaram maior frequência no grupo de pacientes com EDSS  $\leq$  2,5. Já os genótipos *APOA1* ins/del (*rs3138522*) [ $P=0,003$  OR 0,22 IC 0,08-0,62] e *MID-52* ins/del (*rs16344*) [ $P=0,002$  OR=0,29 IC 0,13-0,65] apresentaram maior frequência no grupo com EDSS  $>2,5$  (Tabela 11).

Tabela 11. Frequência genotípica de marcadores de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto na esclerose múltipla mensurada pelo EDSS.

| Marcadores genéticos        | EDSS  |       | p             | OR         | IC               | Marcadores genéticos         | EDSS  |       | p              | OR           | IC                 |
|-----------------------------|-------|-------|---------------|------------|------------------|------------------------------|-------|-------|----------------|--------------|--------------------|
|                             | ≤ 2,5 | > 2,5 |               |            |                  |                              | ≤ 2,5 | > 2,5 |                |              |                    |
| <b>FY- null (rs2814778)</b> |       |       |               |            |                  | <b>APOA1 (rs3138522)</b>     |       |       |                |              |                    |
| AA                          | 50    | 46    | 1             | 1          | 0,46-2,17        | II                           | 58    | 42    | <b>0,02**</b>  | <b>2,83</b>  | <b>1,21-6,62</b>   |
| GG                          | 2     | 5     | 0,26          | 0,35       | 0,06-1,91        | DD                           | 4     | 2     | 0,68           | 1,93         | 0,34-10,96         |
| AG                          | 16    | 12    | 0,53          | 1,33       | 0,57-3,09        | ID                           | 6     | 19    | <b>0,003**</b> | <b>0,22</b>  | <b>0,08-0,62</b>   |
| <b>AT3 (rs3138521)</b>      |       |       |               |            |                  | <b>MID-52 (rs16344)</b>      |       |       |                |              |                    |
| II                          | 6     | 8     | 0,57          | 0,67       | 0,22-2,07        | II                           | 4     | 0     | 0,12           | 9            | 0,47-170,52        |
| DD                          | 36    | 26    | 0,16          | 1,64       | 0,82-3,27        | DD                           | 52    | 36    | <b>0,02**</b>  | <b>2,37</b>  | <b>1,12-5,01</b>   |
| ID                          | 26    | 29    | 0,37          | 0,7        | 0,35-1,4         | ID                           | 12    | 27    | <b>0,002**</b> | <b>0,29</b>  | <b>0,13-0,65</b>   |
| <b>SB19.3 (rs3138524)</b>   |       |       |               |            |                  | <b>MID-575 rs140864)</b>     |       |       |                |              |                    |
| II                          | 51    | 43    | 0,34          | 1,46       | 0,68-3,12        | II                           | 0     | 1     | 0,48           | 0,3          | 0,01-7,73          |
| DD                          | 11    | 10    | 1             | 1,04       | 0,41-2,65        | DD                           | 60    | 51    | 0,33           | 1,73         | 0,65-4,56          |
| ID                          | 6     | 10    | 0,19          | 0,46       | 0,16-1,34        | ID                           | 8     | 11    | 0,45           | 0,64         | 0,24-1,71          |
| <b>PV92 (rs3138523)</b>     |       |       |               |            |                  | <b>MID-93 (rs16383)</b>      |       |       |                |              |                    |
| II                          | 7     | 6     | 1             | 1          | 0,34-3,43        | II                           | 32    | 29    | 1              | 1            | 0,5-1,99           |
| DD                          | 37    | 37    | 0,71          | 0,82       | 0,40-1,67        | DD                           | 4     | 9     | 0,14           | 0,38         | 0,11-1,3           |
| ID                          | 22    | 17    | 0,7           | 1,19       | 0,56-2,53        | ID                           | 32    | 25    | 0,38           | 1,38         | 0,69-2,77          |
| <b>LPL (rs285)</b>          |       |       |               |            |                  | <b>DRD2-BclI (rs1079598)</b> |       |       |                |              |                    |
| TT                          | 28    | 14    | <b>0,02**</b> | <b>2,5</b> | <b>1,16-5,37</b> | TT                           | 6     | 0     | <b>0,02**</b>  | <b>13,41</b> | <b>0,73-243,37</b> |
| CC                          | 10    | 14    | 0,36          | 0,61       | 0,25-1,5         | CC                           | 44    | 49    | 0,12           | 0,51         | 0,23-1,11          |
| TC                          | 30    | 35    | 0,22          | 0,61       | 0,3-1,22         | TC                           | 18    | 14    | 0,55           | 1,28         | 0,57-2,86          |
| <b>RB1 (rs2252544)</b>      |       |       |               |            |                  | <b>CKM (rs4884)</b>          |       |       |                |              |                    |
| TT                          | 26    | 23    | 0,85          | 1,1        | 0,54-2,23        | TT                           | 6     | 9     | 0,41           | 0,59         | 0,19-1,76          |
| CC                          | 9     | 13    | 0,25          | 0,54       | 0,21-1,36        | CC                           | 38    | 28    | 0,29           | 1,52         | 0,76-3,03          |
| TC                          | 33    | 27    | 0,48          | 1,29       | 0,64-2,56        | TC                           | 24    | 26    | 0,59           | 0,79         | 0,39-1,61          |

Adicionalmente, a aplicação de regressão logística para análise de gravidade do primeiro surto da EM, EDSS  $\leq 2,5$  e  $> 2,5$ , corroborou a associação dos genótipos *APOA1* ins/ins, *APOA1* ins/del, *MID52* del/del e *MID52* ins/del com menor gravidade do surto inaugural, EDSS  $\leq 2,5$ , conforme avaliação individual dos alelos componentes do painel de AIMS (Tabela 12- Anexos). Por fim, foi analisada a associação entre os AIMS e gravidade do primeiro surto por estratificação do EDSS considerando o corte no EDSS 5, sendo  $< 5$  e  $\geq 5$  (Tabelas 12-14). A frequência alélica não apresentou resultados estatisticamente significativos (Tabela 13), enquanto os genótipos *MID-52* del/ins ( $P=0,02$  OR=0,31 IC 0,11-0,84) e *DRD2-BclI* T/C(rs1079598) [ $P=0,01$  OR 0,28 IC 0,10-0,78] apresentaram maior frequência nos pacientes com EDSS  $\geq 5$ . No entanto, na amostra estudada, não houve aumento da frequência dos AIMS nos pacientes com EDSS  $\geq 5$  no primeiro surto (Tabela 14). De forma complementar, a aplicação de regressão logística evidenciou associação de proteção com *MID52* Ins/Del e do *DRD2* T/C para grupos de pacientes com EDSS no primeiro surto  $\geq 5$ , corroborando os achados obtidos nas análises com genótipos. Análise similar adicionou o genótipo *MID52* Del/Del em associação com risco de apresentar surto inaugural EDSS  $< 5$  (Tabela 15-Anexos)

Tabela 13. Frequência alélica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto, estratificada em menor que 5 e maior ou igual a 5, na esclerose múltipla mensurada pela Escala de EDSS.

| Marcadores genéticos        | < 5 | ≥ 5 | p    | OR   | IC          | Marcadores genéticos             | < 5 | ≥ 5 | p    | OR   | IC          |
|-----------------------------|-----|-----|------|------|-------------|----------------------------------|-----|-----|------|------|-------------|
| <b>FY- null (rs2814778)</b> |     |     |      |      |             | <b>APOA1 (rs3138522)</b>         |     |     |      |      |             |
| A                           | 190 | 30  |      |      |             | I                                | 196 | 29  |      |      |             |
| G                           | 36  | 6   | 1    | 0,98 | 0,38 - 2,53 | D                                | 30  | 7   | 0,44 | 1,47 | 0,59 - 3,65 |
| <b>AT3 (rs3138521)</b>      |     |     |      |      |             | <b>MID-52 (rs16344)</b>          |     |     |      |      |             |
| I                           | 70  | 13  |      |      |             | I                                | 37  | 10  |      |      |             |
| D                           | 156 | 23  | 0,45 | 0,76 | 0,37 - 1,57 | D                                | 189 | 26  | 0,16 | 0,54 | 0,24 - 1,22 |
| <b>SB19.3 (rs3138524)</b>   |     |     |      |      |             | <b>MID-575 (rs140864)</b>        |     |     |      |      |             |
| I                           | 179 | 25  |      |      |             | I                                | 17  | 4   |      |      |             |
| D                           | 47  | 11  | 0,14 | 1,75 | 0,82-3,74   | D                                | 209 | 32  | 0,51 | 0,69 | 0,21 - 2,18 |
| <b>PV92 (rs3138523)</b>     |     |     |      |      |             | <b>MID-93 (rs16383)</b>          |     |     |      |      |             |
| I                           | 57  | 8   |      |      |             | I                                | 159 | 20  |      |      |             |
| D                           | 161 | 26  | 1    | 1,06 | 0,47- 2,39  | D                                | 67  | 16  | 0,13 | 1,72 | 0,85 - 3,49 |
| <b>LPL (rs285)</b>          |     |     |      |      |             | <b>DRD2-<br/>BclI(rs1079598)</b> |     |     |      |      |             |
| T                           | 131 | 18  |      |      |             | T                                | 35  | 9   |      |      |             |
| C                           | 95  | 18  | 0,38 | 1,37 | 0,69-2,74   | C                                | 191 | 27  | 0,23 | 0,59 | 0,25 - 1,35 |
| <b>RB1 (rs2252544)</b>      |     |     |      |      |             | <b>CKM (rs4884)</b>              |     |     |      |      |             |
| T                           | 133 | 25  |      |      |             | T                                | 71  | 9   |      |      |             |
| C                           | 93  | 11  | 0,47 | 0,74 | 0,36- 1,52  | C                                | 155 | 27  | 0,44 | 1,47 | 0,66 - 3,28 |

Tabela 14. Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à gravidade do primeiro surto, estratificada em menor que 5 e maior ou igual a 5, na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS.

| Marcadores genéticos        | EDSS |    | p / OR (IC)               | Marcadores genéticos         | EDSS      |           | p/OR (IC)                        |
|-----------------------------|------|----|---------------------------|------------------------------|-----------|-----------|----------------------------------|
|                             | <5   | ≥5 |                           |                              | <5        | ≥5        |                                  |
| <b>FY- null (rs2814778)</b> |      |    |                           | <b>APOA1 (rs3138522)</b>     |           |           |                                  |
| AA                          | 83   | 13 | 1 / 0,98 (0,32-2,97)      | II                           | 88        | 12        | 0,38 / 1,62 (0,56-4,71)          |
| GG                          | 6    | 1  | 1 / 1 (0,11-8,89)         | DD                           | 5         | 1         | 1,0 / 0,83 ( 0,09-7,55)          |
| AG                          | 24   | 4  | 1 / 1,01 ( 0,31-3,33 )    | ID                           | 20        | 5         | 0,35 / 0,60 (0,19-1,86)          |
| <b>AT3 (rs3138521)</b>      |      |    |                           | <b>MID-52 (rs16344)</b>      |           |           |                                  |
| II                          | 13   | 1  | 0,69 / 2,34 ( 0,28-19,02) | II                           | 4         | 0         | 1 / 1,06 (0,08-30,98)            |
| DD                          | 56   | 6  | 0,21 / 2,12 (0,75-5,99)   | DD                           | 80        | 8         | 0,06 / 2,69 (1,01-7,23)          |
| ID                          | 44   | 11 | 0,07 / 0,37 (0,13-1,01)   | <b>DI</b>                    | <b>29</b> | <b>10</b> | <b>0,02**/ 0,31 (0,11-0,84)</b>  |
| <b>SB19.3 (rs3138524)</b>   |      |    |                           | <b>MID-575 rs140864)</b>     |           |           |                                  |
| II                          | 83   | 11 | 0,18 / 1,98 (0,72-5,41)   | II                           | 1         | 0         | 1,0 / 0,52 (0,02-13,24)          |
| DD                          | 17   | 4  | 0,50 / 0,66 ( 0,19-2,24)  | DD                           | 97        | 14        | 0,48 / 1,61 (0,47-5,49)          |
| ID                          | 13   | 3  | 0,26 / 0,48 (0,14-1,69)   | DI                           | 15        | 4         | 0,47 / 0,57 (0,16-1,96)          |
| <b>PV92 (rs3138523)</b>     |      |    |                           | <b>MID-93 (rs16383)</b>      |           |           |                                  |
| II                          | 11   | 2  | 1 / 0,89 (0,18-4,43)      | II                           | 55        | 6         | 0,45 / 1,62 (0,59-4,43)          |
| DD                          | 63   | 11 | 1 / 0,87 (0,31-2,42)      | DD                           | 9         | 4         | 0,09 / 0,32 (0,08-1,18)          |
| ID                          | 35   | 4  | 0,79 / 1,23 (0,40-3,72)   | DI                           | 49        | 8         | 1,0 / 1,05 (0,39-2,81)           |
| <b>LPL (rs285)</b>          |      |    |                           | <b>DRD2-BclI (rs1079598)</b> |           |           |                                  |
| TT                          | 39   | 3  | 0,11 / 2,81 (0,77-10,24)  | TT                           | 6         | 0         | 0,59 / 2,35 (0,12-43,6)          |
| CC                          | 21   | 3  | 1 / 1,21 (0,32-4,56)      | CC                           | 84        | 9         | 0,06 / 2,60 (0,96-7,05)          |
| TC                          | 53   | 12 | 0,13 / 0,40 (0,14-1,14)   | <b>TC</b>                    | <b>23</b> | <b>9</b>  | <b>0,01** / 0,28 (0,10-0,78)</b> |
| <b>RB1 (rs2252544)</b>      |      |    |                           | <b>CKM (rs4884)</b>          |           |           |                                  |
| TT                          | 40   | 9  | 0,31 / 0,60 (0,22-1,62)   | TT                           | 13        | 2         | 1 / 1,10 (0,22-5,34)             |
| CC                          | 20   | 2  | 1 / 1,14 (0,30-4,31)      | CC                           | 55        | 11        | 0,32 / 0,55 (0,2-1,5)            |
| CT                          | 53   | 7  | 0,46/ 1,51 (0,55-4,12)    | TC                           | 45        | 5         | 0,31 / 1,85 (0,62-5,5)           |

## 5.DISCUSSÃO

A EM apresenta extensa variabilidade na gravidade dos surtos e na progressão da doença, podendo ser influenciada por fatores ambientais ou susceptibilidade individual. Abordagens epidemiológicas têm revelado que a doença apresenta diferentes graus de incapacidade em grupos étnicos diferentes, o que pode sugerir que a carga genética humana tenha papel relevante na gravidade da doença. A EM é rara em populações africanas, porém a doença apresenta maior gravidade nas populações de indivíduos afro-descendentes<sup>1,81,82</sup>. Outra característica proeminente do espectro clínico da EM é a sua elevada incidência de aparecimento na terceira década de vida e da relativa raridade de manifestações clínicas durante a infância e adolescência<sup>83,84</sup>. Mais frequentemente, a idade de início da EM varia entre 20 e 40 anos, no entanto subgrupos de pacientes podem manifestar a doença precocemente (<16 anos)<sup>83</sup> ou tardiamente (>50 anos)<sup>85,86</sup>.

Este estudo exploratório buscou observar se há associação entre os alelos e/ou genótipos de marcadores de ancestralidade população específica com variáveis clínicas como a idade de início, a gravidade do primeiro surto estratificado em surtos leve (EDSS  $\leq 2,5$ ) e grave (EDSS  $\geq 5$ ) no grupo de pacientes com EM e a frequência entre indivíduos com EM e saudáveis.

Em nosso estudo, a associação entre a frequência alélica e a idade de início, estratificada em <20 anos e  $\geq 20$  anos, evidenciou que o alelo *APOA1 Ins* conferiu proteção contra a instalação precoce da doença (<20 anos), enquanto ao alelo *LPL T* conferiu susceptibilidade para início da doença em pacientes >20 anos (Tabela 8). Interessantemente, análise genotípica mostrou que o genótipo *APOA1 del/del* apresentou maior risco para iniciar a doença precocemente, isto é, <20 anos (Tabela 9). Cabe ressaltar que o alelo *APOA1 del* apresenta frequência diferencial em populações africanas (51% a 64%) quando comparada com populações caucasianas (4,9% a 8,3)<sup>25</sup>. Por outro lado, o alelo *APOA1 Ins*, mais frequente em caucasianos, evidencia proteção contra o início precoce da doença. Para entender esses achados buscamos na literatura informações para explicar tal associação e encontramos um estudo demonstrando que pacientes com idade início <16 anos levam mais tempo para alcançar escores do EDSS de 4.0, 6.0 e 7.0 que os indivíduos com idade

de início entre 16 e 50 anos<sup>87</sup>. No entanto, esses pacientes alcançam escores EDSS mais altos em idade mais precoce, o que poderia tornar o início precoce um fator de pior prognóstico. Considerando que, i) o genótipo *APOA1 del/del* é mais frequente nas populações africanas, ii) ser africano é um fator de pior prognóstico de incapacidade, iii) o início precoce da doença sem distinção de etnia também está também associado com maior morbidade da EM, nosso achado sugere que a presença do genótipo *APOA1 del/del* pode explicar porque os afrodescendentes apresentam pior prognóstico na evolução da EM quando comparados com os caucasianos. Por outro lado, a idade de início tardia, >40 anos, também é fator de mau prognóstico na EM<sup>3,88-91</sup>. Análises com idade estratificada <40 e ≥40 anos foram realizadas e não obtivemos nenhuma associação (dados não apresentados).

Considerando que a apolipoproteína A-I apresenta papel importante na resposta inflamatória e que níveis elevados de lipoproteína de alta densidade (HDL) na EM estão associados com menor volume de lesão captando contraste, ao passo que níveis reduzidos estão associados com progressão da doença<sup>12</sup>, é plausível assumir que esse gene ou outros que possam estar em desequilíbrio de ligação<sup>25</sup> influenciem a gravidade da EM em afrodescendentes. Outro gene do painel de AIMs que apresentou perfil diferencial nesta série é o que codifica a lipase lipoproteica (LPL), cuja função principal é a hidrólise de triglicérides e a hipertrigliceridemia pode refletir deficiência de atividade dessa enzima<sup>47</sup>. Neste estudo, o genótipo *LPL T/T* apresentou maior frequência no grupo de pacientes com EDSS ≤ 2,5, caracterizando surto leve. Considerando que o genótipo *LPL T/T*: i) é mais frequente em africanos<sup>92</sup> e ii) apresentou associação com surto leve, aparentemente, esse genótipo não contribuiria com acúmulo de deficiências mais expressivas da EM por surto em longo prazo de evolução. Embora alguns alelos do gene *LPL* estejam associados com níveis dislipidêmicos na população africana<sup>61</sup>, o SNP *LPL T-C* ainda não foi estudado quanto a função ou quantidade da proteína codificada.

Em adição aos AIMs *LPL* e *APOA1*, os AIMs *MID-52* e o *DRD2-BclI* também apresentaram associação com a gravidade da EM. O genótipo *MID-52 Del/Del* apresentou associação de risco para surtos leves. Em contraste, na aplicação de regressão logística o genótipo *MID-52 Ins/Del* não corroborou os achados prévios. Já o alelo *DRD2-BclI T*, foi mais frequente no grupo de

pacientes que apresentou o EDSS do primeiro surto  $>2,5$ . O genótipo *DRD2-BclI* T/T, mais frequente em africanos, evidenciou maior chance de apresentar  $EDSS \leq 2,5$  no primeiro surto da EM. O genótipo *DRD2-BclI* T/C, que também é mais frequente em africanos, apresentou maior frequência no grupo com  $EDSS < 5$  no primeiro surto. O gene *DRD2* codifica receptor D2 de dopamina (DA) presente nos neurônios dopaminérgicos e nas células T que também sintetizam e armazenam a dopamina<sup>63,64,93</sup>. Em estudo *in vitro*, foi observado que a dopamina ativa células T virgens e inibe células T ativadas e promove redução da secreção de citocinas, da proliferação, da adesão e da migração mediada por integrinas<sup>63,64</sup>. Estudos experimentais com o modelo de EM, evidenciou que depleção de dopamina exacerba as manifestações da EAE<sup>66</sup>. Adicionalmente, medicamentos agonistas de receptores dopaminérgicos da classe D2 reduzem a gravidade das manifestações na EAE<sup>94</sup>. Níveis de prolactina<sup>95</sup> e oxidação de radicais livres<sup>93</sup> são sugeridos, porém o papel das diferentes classes de receptores da dopamina nas células imunes e a sua sinalização intracelular na regulação das funções de diferentes células imunes efectoras não está esclarecido. Não houve associação entre qualquer AIMS e gravidade de primeiro surto com EDSS 5. O genótipo *MID52* ins/del foi mais frequente no grupo com  $EDSS > 5$  no primeiro surto.

A população caucasiana apresenta em quase 100% dos indivíduos o genótipo *FY-null* T/T (rs2814778), em contrapartida, os africanos carregam predominantemente o genótipo *FY-null* G/G (rs2814778) e esse polimorfismo ocorre na região promotora do gene *DARC* que pode influenciar a taxa de expressão do receptor *DARC*<sup>42</sup>. O grupo brasileiro aqui estudado apresentou 52% de heterozigose, (*FY-null* G/T rs3814778) refletindo a mistura entre europeus e africanos na nossa população. O genótipo *Fy-null* G/G (rs2814778) tem reconhecida consequência funcional patogênica<sup>34,96</sup> de apresentar baixa ou ausência de expressão do receptor *DARC* nos eritrócitos<sup>37,97,98</sup>, que está associado a negatividade do receptor Duffy<sup>37</sup>, resistência à malária pelo *Plasmodium falciparum*<sup>34,96</sup> e neutropenia benigna em africanos<sup>99</sup>.

Nossos resultados evidenciaram que o grupo de indivíduos brasileiros com EM carregando o genótipo em heterozigose *FY-null* T/G (rs2814778) apresentou proteção para o desenvolvimento da doença quando comparados com a população controle. O alelo *FY-null* G rs2814778 apresenta diferencial

distribuição mundial, sendo predominante na África Ocidental, particularmente na região subsaariana e baixa frequência na Europa, América do Norte e Ásia<sup>42</sup>. Interessantemente, a EM também apresenta diferencial distribuição mundial com alta prevalência na Europa e América do Norte (>100/100.000 habitantes) e rara na África<sup>100</sup>, regiões com baixa e alta frequência do alelo *FY-null* G, respectivamente. Portanto, associação do genótipo *FY-null* T/G com proteção a EM no grupo de brasileiros estudados sugere que esse polimorfismo possa ter um papel na resistência ao desenvolvimento da doença. A interpretação desse achado pode ser respaldado pelo estudo experimental que demonstrou manifestações clínicas de EAE mais leves em camundongo deficientes de DARC (*C57BL/6 Darc-/-* e *SJL Darc-/-*) no endotélio da barreira hematoencefálica (BHE) quando comparado com camundongos selvagens<sup>40</sup>. Considerando que, i) afrodescendentes exibem deficiência do DARC<sup>96</sup> e ii) a EM é rara na África<sup>100</sup>, região com deficiência do DARC e iii) camundongos deficientes de DARC quando submetidos a EAE apresentam manifestações clínicas mais leves<sup>40</sup>, o papel dessa molécula pode estar relacionado com proteção contra o desenvolvimento da EM e da EAE, assim como na promoção de surtos mais leves. No Brasil, a prevalência da EM varia de baixa (1,3/100.000 habitantes, Recife, nordeste)<sup>20</sup> a média (27/100.000, Santa Maria, Rio grande do Sul)<sup>101</sup>. apresentando padrão de distribuição gradiente norte sul<sup>2</sup>. A maior contribuição europeia também obedece esse padrão dentro do país<sup>102</sup>. Então, a associação do genótipo *FY-null* G/T com proteção a EM poderia ser um fator para explicar a prevalência mais baixa da EM em populações afrodescendentes<sup>2,20,103</sup>. Estudos da frequência dos alelos *FY-null* em diferentes regiões brasileiras talvez possa auxiliar na explicação da distribuição da EM no Brasil.

Complementando a análise da chance de diagnóstico de EM, a taxa de heterozigose também se mostrou reduzida em *AT3 ins/del* como apresentado na Tabela 7. A concomitância da associação com proteção na EM dos SNP *rs2814778* e *rs138521* pode simplesmente refletir desequilíbrio de ligação entre esses dois marcadores, o que já foi evidenciado previamente<sup>25</sup>.

As limitações desse estudo, além do tamanho da amostra, consiste em estudar marcadores de ancestralidade população específica em doença com fatores de risco associado a determinada população. Portanto, assumimos que

se a ancestralidade africana ou caucasiana está associada a determinado aspecto clínico e houve associação dos marcadores de ancestralidade com o mesmo aspecto, esse achado apresenta grande potencial de ser uma associação espúria. Também não significa que exatamente o marcador genético em questão seja o responsável pelos efeitos dessa associação. Assumimos também que estudos experimentais podem evidenciar a existência de associação real e se contrapor à interpretação inicial de associação espúria. Neste contexto, a associação do genótipo *LPL* T/T com surto inicial mais leve pode ser valorizado, pois apesar do *LPL* T/T ser mais frequente em africano não associou com surtos mais graves, condição que não fortalece esse achado como associação espúria. Adicionalmente, entre os alelos mais frequentes em africanos - *LPL*, *RB* e *AT3*, somente o *LPL* apresentou essa associação. Também os achados com *FY-null* podem ser considerados de maneira semelhante

## **6.CONCLUSÃO**

Marcadores genéticos com perfil população alelo específico pode influenciara taxa de manifestação da EM e aspectos clínicos da doença, explicando algumas peculiaridades da doença em diferentes populações. O genótipo *APOA1* ins/ins (rs3138522) parece estar associado à menor gravidade do primeiro surto dos pacientes com EM, em contrapartida o *FY-null* A/G (rs2814778) está associado a menor risco de desenvolvimento da doença.

# ANEXOS

Tabela 1.Frequência alélica dos marcadores informativos de ancestralidade nas populações africanas, europeias, ameríndias e pacientes com esclerose múltipla e controles.

| Marcador                       | Tipo/Alelo | Posição<br>gênica | EM-RP<br>(n=132) | CTRL-RP<br>(n=108) | EUR<br>(n=132) | AFR<br>(n = 128) | AMR<br>(n = 48) | AFR/<br>EUR | AFR/<br>AMR | EUR/ AMR |
|--------------------------------|------------|-------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|-----------------|-------------|-------------|----------|
| <i>FY-null*1 (rs2814778)</i>   | SNP/A      | 1q23.2            | 0,863            | 0,85               | 0,993          | 0                | 1               | 0,993       | 1           | 0,007    |
| <i>RB1*1 (rs2252544)</i>       | SNP/A      | 13q14.2           | 0,355            | 0,397              | 0,309          | 0,92             | 0,167           | 0,611       | 0,753       | 0,142    |
| <i>LPL*1 (rs285)</i>           | SNP/T      | 8p21.3            | 0,569            | 0,584              | 0,529          | 0,98             | 0,478           | 0,451       | 0,502       | 0,051    |
| <i>AT3*1 (rs3138521)</i>       | Indel/Ins  | 1q25.1            | 0,31             | 0,421              | 0,279          | 0,86             | 0,021           | 0,581       | 0,839       | 0,258    |
| <i>APOA1*1 (rs3138522)</i>     | Alu/Ins    | 11q23.3           | 0,883            | 0,874              | 0,919          | 0,453            | 0,99            | 0,466       | 0,537       | 0,071    |
| <i>PV92*1 (rs3138523)</i>      | Alu/Ins    | 16q24.1           | 0,258            | 0,336              | 0,11           | 0,187            | 0,935           | 0,077       | 0,748       | 0,825    |
| <i>CKM*1 (rs4884)</i>          | SNP/T      | 19q13.32          | 0,294            | 0,341              | 0,287          | 0,16             | 0,814           | 0,127       | 0,654       | 0,527    |
| <i>DRD2-BclI*1 (rs1079598)</i> | SNP/C      | 11q23.1           | 0,165            | 0,131              | 0,132          | 0,087            | 0,479           | 0,045       | 0,392       | 0,347    |
| <i>MID-52*1 (rs16344)</i>      | Indel/Del  | 4q24              | 0,177            | 0,182              | 0,074          | 0,2              | 0,755           | 0,126       | 0,555       | 0,681    |
| <i>MID-575*1 (rs140864)</i>    | Indel/Ins  | 1p34.3            | 0,081            | 0,075              | 0,993          | 0,873            | 0,564           | 0,12        | 0,309       | 0,429    |
| <i>MID-93*1 (rs16383)</i>      | Indel/Del  | 22q13.2           | 0,694            | 0,561              | 0,816          | 0,3              | 0,188           | 0,516       | 0,112       | 0,628    |
| <i>SB19.3*1 (rs3138524)</i>    | Alu/Ins    | 19p13.11          | 0,794            | 0,804              | 0,904          | 0,507            | 0,708           | 0,397       | 0,201       | 0,196    |

Tabela 3. Estado de validação e alelo ancestral dos genes marcadores informativos de ancestralidade

| SNP                     | Validação_Status                         | alelo: sequência         | Predomínio   | alelo ancestral | Significado clínico | loci cromossomo |
|-------------------------|------------------------------------------|--------------------------|--------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| <i>FY-null</i>          | <i>by 1000G,by 2hit 2allele</i>          | 1: TTCCAAG[A]TAAGAGCC    | Eur          | A               | patogênico          | 1:159204893     |
| <i>(rs2814778)</i>      | <i>by cluster,by frequency,by hapmap</i> | 2: CTTCCAAG[G]TAAGAGC    | Afric        |                 |                     |                 |
| <i>RB</i>               | <i>by 1000G,by 2hit 2allele</i>          | 1: GCCGGGA[T]CCGGCCC     | Eur          |                 | desconhecido        | 13:48304156     |
| <i>(rs2252544)</i>      | <i>by cluster,by frequency,by hapmap</i> | 2: GCCGGGA[C]CCGGCCC     | Afric        | C               |                     |                 |
| <i>LPL</i>              | <i>by 1000G,by cluster</i>               | 1: CTTTTAG[T]AGCTGTGT    | Afric        | T               | desconhecido        | 8:19957678      |
| <i>(rs285)</i>          | <i>by frequency,by hapmap</i>            | 2: CTTTTAG[C]AGCTGTGT    | Asiat        |                 |                     |                 |
| <i>AT3 (rs3138521)</i>  | <i>desconhecido</i>                      | 1: GAGAGGG[+]TTTCCTAA    | Eur          | desconhecido    | desconhecido        | 1:173917605     |
| <i>SERPINC1</i>         |                                          | 2: GAGAGGG[-]TTTCCTAA    | Afric        |                 |                     |                 |
| <i>APOA1</i>            |                                          | 1: CCTTCT[(ALU)]AAAACT   | Eur          | desconhecido    | desconhecido        | desconhecido    |
| <i>(rs3138522)</i>      | <i>frequência</i>                        | 2: GCCTTCT[-]AAAACTCC    | Afric        |                 |                     |                 |
| <i>PV92</i>             |                                          | 1: GGAAAGAA(-)AGAATTTC   | Eur e Afric  | desconhecido    | desconhecido        | desconhecido    |
| <i>(rs3138523)</i>      | <i>frequência</i>                        | 2: AAAGAA[(ALU)]AGAATT   | Amer         |                 |                     |                 |
| <i>CKM</i>              | <i>by 1000G,by 2hit 2allele</i>          | 1: CCAGTCCAT[C]GACGAC    | Eur e Afric  | C               | desconhecido        | 19:45306777     |
| <i>(rs4884)</i>         | <i>by cluster,by frequency,by hapmap</i> | 2: AGTCCAT[T]GACGACAT    | Amer         |                 |                     |                 |
| <i>DRD2-BclI</i>        | <i>by 1000G,by 2hit 2allele</i>          | 1: GCGAATC[T]GATCATGT    | Eur e Afric  | T               | desconhecido        | 11:113425552    |
| <i>(rs1079598)</i>      | <i>by cluster,by frequency</i>           | 2: GCGAATC[C]GATCATGT    | Amer         |                 |                     |                 |
| <i>MID-52</i>           | <i>SNP não encontrado</i>                | 1: TCTGCTC[-/TTC]AAGTTC  | desconhecido | desconhecido    | desconhecido        | desconhecido    |
| <i>(rs16344)</i>        |                                          | 2: TCTGCTC[-/TTC]AAGTTC  | desconhecido |                 |                     |                 |
| <i>MID-575</i>          | <i>by 1000G</i>                          | 1: ATCTGCTC[TTC]AAGTTC   | Eur          | desconhecido    | desconhecido        | 1:35926061      |
| <i>(rs140864)</i>       | <i>by cluster,by frequency</i>           | 2: AATCTGCTC[-]AAGTTCA   | desconhecido |                 |                     |                 |
| <i>MID-93 (rs16383)</i> | <i>by 1000G</i>                          | 1: CACAAAAGA[-]TAGGGTTC  | Eur          | desconhecido    | desconhecido        | 22:41652247     |
| <i>XRCC6</i>            | <i>by cluster,by frequency</i>           | 2: CAAAAGA[AGA]TAGGGT    | Afric e Amer |                 |                     |                 |
| <i>SB19.3</i>           |                                          | 1: TGTGGCC[(ALU)]AAAAAGT | Eur e Amer   | desconhecido    | desconhecido        | desconhecido    |
| <i>(rs3138524)</i>      | <i>frequência</i>                        | 2: TGTGGCC(-)AAAAAGTGTC  | Afric        |                 |                     |                 |

Tabela 4. Aspectos gerais sobre os genes marcadores de ancestralidade.

| Marcador                                 | Gene                                       | Aliases                                             | Posição genética (cromossomo) | Expressão celular | Expressão tecidual                                                            |
|------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>FY-null(rs2814778)</i>                | Receptor atípico de quimiocinas            | ACKR1,CCBP1, CD234, DARC, Dfy, FY, GPD, GpFy, WBCQ1 | 1q23.2                        | membrana          | eritrócitos, capilares e vênulas pós-capilares dos rins,dos pulmões e do SNC. |
| <i>RB (rs2252544)</i>                    | Retinoblastoma 1                           | RB1; pRb; OSRC; pp110; p105-Rb; PPP1R130            | 13q14.2                       | intracelular      | retina, pineal, osso                                                          |
| <i>LPL (rs285)</i>                       | Lipase lipoproteica                        | LIPD, HDLCQ11                                       | 8p21.3                        | —                 | músculo, coração e tecido adiposo/ capilares                                  |
| <i>AT3 (rs3138521)</i>                   | Inibidor serpin da peptidase, antitrombina | SERPINC1, AT3D, ATIII, THPH7                        | 1q25.1                        | —                 | sangue periférico/ plasma                                                     |
| <i>APOA1 (rs3138522)</i>                 | Apolipoproteína A                          | desconhecido                                        | 11q23.3                       | —                 | sangue periférico                                                             |
| <i>PV92 (rs3138523)</i>                  | desconhecido                               | desconhecido                                        | 16q24.1                       | desconhecido      | desconhecido                                                                  |
| <i>CKM (rs4884)</i>                      | Creatinocinase muscular                    | desconhecido                                        | 19q13.32                      | desconhecido      | desconhecido                                                                  |
| <i>DRD2-BclI (rs1079598)</i>             | Receptor D2 de dopamina                    | D2R, D2DR                                           | 11q23.1                       | membrana          | neurônios dopaminérgicos e células do sistema imune                           |
| <i>MID-52 (rs16344)</i>                  | desconhecido                               | desconhecido                                        | 4q24                          | desconhecido      | desconhecido                                                                  |
| <i>MID-575 (rs140864)</i><br><i>AGO3</i> | Argonauta 3                                | EIF2C3                                              | 1p34.3                        | desconhecido      | desconhecido                                                                  |
| <i>MID-93(rs16383)</i><br><i>XRCC6</i>   | Reparo por raio-x de células defeituosas   | ML8, KU70, TLAA, CTC75, CTCBF, G22P1                | 22q13.2                       | desconhecido      | desconhecido                                                                  |
| <i>SB19.3 (rs3138524)</i>                | desconhecido                               | desconhecido                                        | 19p13.11                      | desconhecido      | desconhecido                                                                  |

Tabela 8a. Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à idade estratificada na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS.

| Marcadores                  | < 20 | ≥ 20 | p    | OR   | IC        | Marcadores                | < 20     | ≥ 20     | p              | OR        | IC                |
|-----------------------------|------|------|------|------|-----------|---------------------------|----------|----------|----------------|-----------|-------------------|
| <b>FY- null (rs2814778)</b> |      |      |      |      |           | <b>APOA1 (rs3138522)</b>  |          |          |                |           |                   |
| <b>AA</b>                   | 14   | 82   | 0,39 | 1,95 | 0,52-7,19 | <b>II</b>                 | 10       | 90       | 0,13           | 0,41      | 0,14-1,19         |
| AG+GG                       | 3    | 32   |      |      |           | ID+DD                     | 7        | 24       |                |           |                   |
| <b>GG</b>                   | 0    | 7    | 0,59 | 0,38 | 0,02-7,08 | <b>DD</b>                 | <b>4</b> | <b>2</b> | <b>0,003**</b> | <b>16</b> | <b>2,68-95,49</b> |
| AG+AA                       | 17   | 107  |      |      |           | ID+II                     | 13       | 112      |                |           |                   |
| <b>AG</b>                   | 3    | 25   | 0,76 | 0,71 | 0,19-2,65 | <b>ID</b>                 | 3        | 22       | 1              | 0,83      | 0,22-3,14         |
| AA+GG                       | 14   | 89   |      |      |           | II+DD                     | 14       | 92       |                |           |                   |
| <b>AT3 (rs3138521)</b>      |      |      |      |      |           | <b>MID-52 (rs16344)</b>   |          |          |                |           |                   |
| <b>II</b>                   | 1    | 13   | 0,69 | 0,45 | 0,05-3,72 | <b>II</b>                 | 1        | 3        | 0,44           | 2,17      | 0,21-22,16        |
| ID+ DD                      | 16   | 101  |      |      |           | ID+ DD                    | 16       | 111      |                |           |                   |
| <b>DD</b>                   | 10   | 52   | 0,45 | 1,49 | 0,54-4,05 | <b>DD</b>                 | 11       | 77       | 1              | 0,96      | 0,33-2,76         |
| ID+II                       | 7    | 62   |      |      |           | ID+II                     | 6        | 37       |                |           |                   |
| <b>ID</b>                   | 6    | 49   | 0,8  | 0,84 | 0,30-2,33 | <b>ID</b>                 | 5        | 34       | 1              | 0,9       | 0,29-2,73         |
| II+DD                       | 11   | 65   |      |      |           | II+DD                     | 12       | 80       |                |           |                   |
| <b>SB19.3 (rs3138524)</b>   |      |      |      |      |           | <b>MID-575 (rs140864)</b> |          |          |                |           |                   |
| <b>II</b>                   | 14   | 80   | 0,58 | 1,48 | 0,45-4,84 | <b>II</b>                 | 0        | 1        | 1              | 2,04      | 0,08-52,16        |
| ID+ DD                      | 3    | 34   |      |      |           | ID+ DD                    | 17       | 113      |                |           |                   |
| <b>DD</b>                   | 2    | 19   | 0,73 | 0,62 | 0,13-2,97 | <b>DD</b>                 | 17       | 93       | 0,07           | 8,5       | 0,49-146,87       |
| ID+II                       | 15   | 95   |      |      |           | ID+II                     | 0        | 21       |                |           |                   |
| <b>ID</b>                   | 1    | 15   | 1    | 0,82 | 0,17-3,95 | <b>ID</b>                 | 0        | 20       | 0,07           | 0,12      | 0,01-2,15         |
| II+DD                       | 16   | 99   |      |      |           | II+DD                     | 17       | 94       |                |           |                   |

Tabela 8a (continuação). Frequência genotípica de marcadores informativos de ancestralidade e sua distribuição em relação à idade estratificada na esclerose múltipla mensurada pela escala de EDSS.

| Marcadores              | < 20 | ≥ 20 | p    | OR   | IC        | Marcadores                  | < 20 | ≥ 20 | p    | OR   | IC        |
|-------------------------|------|------|------|------|-----------|-----------------------------|------|------|------|------|-----------|
| <b>PV92 (rs3138523)</b> |      |      |      |      |           | <b>MID-93 (rs16383)</b>     |      |      |      |      |           |
| <i>II</i>               | 1    | 12   | 0,69 | 0,47 | 0,05-3,9  | <i>II</i>                   | 7    | 50   | 1    | 1,02 | 0,37-2,78 |
| <i>ID+ DD</i>           | 16   | 97   |      |      |           | <i>ID+ DD</i>               | 10   | 64   |      |      |           |
| <b>DD</b>               | 8    | 66   | 0,2  | 0,52 | 0,19-1,42 | <b>DD</b>                   | 2    | 11   | 0,69 | 1,17 | 0,23-5,77 |
| <i>ID+II</i>            | 9    | 43   |      |      |           | <i>ID+II</i>                | 15   | 103  |      |      |           |
| <b>ID</b>               | 8    | 31   | 0,09 | 2,51 | 0,91-6,93 | <b>ID</b>                   | 8    | 53   | 1    | 0,92 | 0,33-2,50 |
| <i>II+DD</i>            | 9    | 78   |      |      |           | <i>II+DD</i>                | 9    | 61   |      |      |           |
| <b>LPL (rs285)</b>      |      |      |      |      |           | <b>DRD2-BclI(rs1079598)</b> |      |      |      |      |           |
| <b>TT</b>               | 9    | 33   | 0,1  | 2,45 | 0,89-6,73 | <b>TT</b>                   | 0    | 6    | 1    | 0,45 | 0,02-8,35 |
| <i>TC+ CC</i>           | 8    | 81   |      |      |           | <i>TC+ CC</i>               | 17   | 108  |      |      |           |
| <b>CC</b>               | 1    | 23   | 0,19 | 0,23 | 0,02-1,84 | <b>CC</b>                   | 11   | 82   | 0,77 | 0,78 | 0,26-2,25 |
| <i>TC+ TT</i>           | 16   | 91   |      |      |           | <i>TC+ TT</i>               | 6    | 32   |      |      |           |
| <b>TC</b>               | 7    | 58   | 0,8  | 0,77 | 0,28-2,09 | <b>TC</b>                   | 6    | 26   | 0,37 | 1,69 | 0,57-4,95 |
| <i>TT+CC</i>            | 10   | 56   |      |      |           | <i>TT+CC</i>                | 11   | 88   |      |      |           |
| <b>RB1 (rs2252544)</b>  |      |      |      |      |           | <b>CKM(rs4884)</b>          |      |      |      |      |           |
| <b>TT</b>               | 5    | 44   | 0,44 | 0,61 | 0,20-1,83 | <b>TT</b>                   | 0    | 15   | 0,22 | 0,17 | 0,01-3,03 |
| <i>TC+ CC</i>           | 12   | 70   |      |      |           | <i>TC+ CC</i>               | 17   | 99   |      |      |           |
| <b>CC</b>               | 2    | 20   | 1    | 0,94 | 0,24-3,55 | <b>CC</b>                   | 9    | 57   | 0,8  | 1,25 | 0,45-3,39 |
| <i>TC+ TT</i>           | 15   | 94   |      |      |           | <i>TC+ TT</i>               | 8    | 57   |      |      |           |
| <b>TC</b>               | 10   | 50   | 0,44 | 1,6  | 0,58-4,35 | <b>TC</b>                   | 8    | 42   | 0,6  | 1,37 | 0,50-3,74 |
| <i>TT+CC</i>            | 7    | 64   |      |      |           | <i>TT+CC</i>                | 9    | 72   |      |      |           |

Tabela 9. Análise de associação entre idade de início, por estatificação, e marcadores de ancestralidade na esclerose múltipla

| Marcadores                        | P    | OR     | IC        | Marcadores                          | P              | OR           | IC                 |
|-----------------------------------|------|--------|-----------|-------------------------------------|----------------|--------------|--------------------|
| <b><i>FY-null (rs2814778)</i></b> |      |        |           | <b><i>APOA1 (rs3138522)</i></b>     |                |              |                    |
| AA                                | ??   | ??     | ??        | II                                  | 0,06           | 0,36         | 0,12-1,06          |
| AG                                | 0,67 | 0,75   | 0,20-2,83 | ID                                  | 0,92           | 0,93         | 0,24-3,56          |
| GG                                | 0,97 | <0,001 | >999,999  | <b>DD</b>                           | <b>0,001**</b> | <b>17,07</b> | <b>2,84-102,48</b> |
| <b><i>AT3 (rs23138521)</i></b>    |      |        |           | <b><i>MID-52 (rs16344)</i></b>      |                |              |                    |
| II                                | 0,49 | 0,48   | 0,06-3,93 | DD                                  | 0,77           | 0,85         | 0,29-2,50          |
| ID                                | 0,57 | 0,73   | 0,25-2,13 | DI                                  | 0,98           | 1,01         | 0,33-3,09          |
| DD                                | 0,32 | 1,67   | 0,59-4,71 | II                                  | 0,48           | 2,29         | 0,22-23,39         |
| <b><i>SB19.3 (rs3138524)</i></b>  |      |        |           | <b><i>MID-575 (rs140864)</i></b>    |                |              |                    |
| II                                | 0,28 | 2,03   | 0,54-7,54 | DD                                  | 0,96           | >999,99      | <0,001-->999,99    |
| ID                                | 0,4  | 0,4    | 0,05-3,30 | DI                                  | 0,96           | >999,99      | <0,001-->999,99    |
| DD                                | 0,6  | 0,66   | 0,13-3,12 | II                                  | 0,99           | >999,99      | <0,001-->999,99    |
| <b><i>PV92 (rs3138523)</i></b>    |      |        |           | <b><i>MID-93 (rs16383)</i></b>      |                |              |                    |
| II                                | 0,51 | 0,5    | 0,06-4,11 | DD                                  | 0,69           | 1,37         | 0,27-6,88          |
| ID                                | 0,13 | 2,2    | 0,78-6,24 | DI                                  | 0,81           | 0,88         | 0,31-2,48          |
| DD                                | 0,31 | 0,58   | 0,21-1,64 | II                                  | 0,99           | 1            | 0,36-2,79          |
| <b><i>LPL (rs285)</i></b>         |      |        |           | <b><i>DRD2-BcII (rs1079598)</i></b> |                |              |                    |
| TT                                | 0,05 | 2,72   | 0,96-7,67 | TT                                  | 0,97           | <0,001       | >999,99            |
| TC                                | 0,47 | 0,68   | 0,24-1,93 | TC                                  | 0,27           | 1,82         | 0,61-5,41          |
| CC                                | 0,18 | 0,24   | 0,03-1,94 | CC                                  | 0,55           | 0,72         | 0,24-2,12          |
| <b><i>RB1 (rs2252544)</i></b>     |      |        |           | <b><i>CKM (rs4884)</i></b>          |                |              |                    |
| CC                                | 0,54 | 0,62   | 0,13-2,92 | TT                                  | 0,96           | <0,001       | <0,001-->999,99    |
| CT                                | 0,23 | 1,86   | 0,66-5,25 | TC                                  | 0,43           | 1,5          | 0,53-4,19          |
| TT                                | 0,45 | 0,65   | 0,21-1,98 | CC                                  | ??             | ??           | ??                 |

Tabela 12. Relação entre marcadores de ancestralidade e gravidade do primeiro surto estratificada, menor ou igual a 2,5 e maior do que 2,5, pela Escala de EDSS nos pacientes com esclerose múltipla

| Marcadores                       | P             | OR         | IC               | Marcadores                          | P              | OR          | IC                |
|----------------------------------|---------------|------------|------------------|-------------------------------------|----------------|-------------|-------------------|
| <b><i>FY-null(rs2814778)</i></b> |               |            |                  | <b><i>APOA1 (rs3138522)</i></b>     |                |             |                   |
| AA                               | 0,94          | 0,97       | 0,44-2,11        | II                                  | <b>0,01**</b>  | <b>0,34</b> | <b>0,15-0,81</b>  |
| AG                               | 0,53          | 0,76       | 0,32-1,77        | ID                                  | <b>0,003**</b> | <b>4,46</b> | <b>1,64-12,07</b> |
| GG                               | 0,22          | 2,84       | 0,53-15,20       | DD                                  | 0,46           | 0,52        | 0,09-2,96         |
| <b><i>AT3 (rs23138521)</i></b>   |               |            |                  | <b><i>MID-52 (rs16344)</i></b>      |                |             |                   |
| II                               | 0,47          | 1,5        | 0,49-4,60        | DD                                  | <b>0,01**</b>  | <b>0,41</b> | <b>0,19-0,86</b>  |
| ID                               | 0,36          | 1,37       | 0,68-2,76        | DI                                  | <b>0,002**</b> | <b>3,49</b> | <b>1,57-7,77</b>  |
| DD                               | 0,18          | 0,62       | 0,31-1,24        | II                                  | 0,98           | <0,001      | <0,001->999,99    |
| <b><i>SB19.3 (rs3138524)</i></b> |               |            |                  | <b><i>MID-575 (rs140864)</i></b>    |                |             |                   |
| II                               | 0,42          | 0,73       | 0,34-1,57        | DD                                  | 0,25           | 0,56        | 0,21-1,49         |
| ID                               | 0,22          | 1,95       | 0,66-5,72        | DI                                  | 0,35           | 1,58        | 0,59-4,24         |
| DD                               | 0,96          | 0,97       | 0,38-2,48        | II                                  | 0,99           | >999,99     | <0,001->999,99    |
| <b><i>PV92 (rs3138523)</i></b>   |               |            |                  | <b><i>MID-93 (rs16383)</i></b>      |                |             |                   |
| II                               | 0,91          | 0,93       | 0,29-2,96        | DD                                  | 0,11           | 2,66        | 0,77-9,14         |
| ID                               | 0,54          | 0,79       | 0,37-1,69        | DI                                  | 0,39           | 0,74        | 0,37-1,48         |
| DD                               | 0,52          | 1,26       | 0,61-2,57        | II                                  | 0,9            | 0,96        | 0,48-1,90         |
| <b><i>LPL (rs285)</i></b>        |               |            |                  | <b><i>DRD2-BclI (rs1079598)</i></b> |                |             |                   |
| TT                               | <b>0,02**</b> | <b>0,4</b> | <b>0,19-0,87</b> | TT                                  | 0,97           | <0,001      | <0,001->999,99    |
| TC                               | 0,19          | 1,58       | 0,79-3,15        | TC                                  | 0,57           | 0,79        | 0,35-1,77         |
| CC                               | 0,62          | 1,65       | 0,67-4,06        | CC                                  | 0,1            | 1,9         | 0,88-4,14         |
| <b><i>RB1 (rs2252544)</i></b>    |               |            |                  | <b><i>CKM (rs4884)</i></b>          |                |             |                   |
| CC                               | 0,62          | 1,7        | 0,67-4,31        | TT                                  | 0,33           | 1,72        | 0,57-5,15         |
| CT                               | ?             |            |                  | TC                                  | 0,48           | 1,28        | 0,63-2,61         |
| TT                               | ?             |            |                  | CC                                  | 0,19           | 0,63        | 0,31-1,25         |

Tabela 14a. Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e gravidade na esclerose múltipla.

| Marcadores                        | <5  | ≥ 5 | p/OR (IC)                 | Marcadores                       | <5        | ≥ 5       | p/OR (IC)                       |
|-----------------------------------|-----|-----|---------------------------|----------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------|
| <b><i>FY-null (rs2814778)</i></b> |     |     |                           | <b><i>APOA1 (rs3138522)</i></b>  |           |           |                                 |
| AA                                | 83  | 13  | 1 / 0,98 (0,32-2,97)      | II                               | 88        | 12        | 0,38 / 1,62 (0,56-4,71)         |
| AG+GG                             | 30  | 5   |                           | ID+DD                            | 25        | 6         |                                 |
| AG                                | 24  | 4   | 1 / 1,01 ( 0,31-3,33 )    | ID                               | 20        | 5         | 0,35 / 0,60 (0,19-1,86)         |
| AA+GG                             | 89  | 14  |                           | II+DD                            | 93        | 13        |                                 |
| GG                                | 6   | 1   | 1/ 1 (0,11-8,89)          | DD                               | 5         | 1         | 1,0 / 0,83 ( 0,09-7,55)         |
| AA+AG                             | 107 | 17  |                           | II+ ID                           | 108       | 17        |                                 |
| <b><i>AT3 (rs3138521)</i></b>     |     |     |                           | <b><i>MID-52(rs16344)</i></b>    |           |           |                                 |
| II                                | 13  | 1   | 0,69 / 2,34 ( 0,28-19,02) | DD                               | 80        | 8         | 0,06 / 2,69 (1,01-7,23)         |
| ID+DD                             | 100 | 17  |                           | ID+II                            | 33        | 10        |                                 |
| ID                                | 44  | 11  | 0,07 / 0,37 (0,13-1,01)   | <b>DI</b>                        | <b>29</b> | <b>10</b> | <b>0,02**/ 0,31 (0,11-0,84)</b> |
| II+DD                             | 69  | 7   |                           | <b>DD+II</b>                     | <b>84</b> | <b>8</b>  |                                 |
| DD                                | 56  | 6   | 0,21 / 2,12 (0,75-5,99)   | II                               | 4         | 0         | 1 / 1,06 (0,08-30,98)           |
| II+ID                             | 57  | 12  |                           | DD+ID                            | 109       | 18        |                                 |
| <b><i>SB19.3 (rs3138524)</i></b>  |     |     |                           | <b><i>MID-575 (rs140864)</i></b> |           |           |                                 |
| II                                | 83  | 11  | 0,18 / 1,98 (0,72-5,41)   | DD                               | 97        | 14        | 0,48 / 1,61 (0,47-5,49)         |
| ID+DD                             | 30  | 7   |                           | DI+II                            | 16        | 4         |                                 |
| ID                                | 13  | 3   | 0,26 / 0,48 (0,14-1,69)   | DI                               | 15        | 4         | 0,47 / 0,57 (0,16-1,96)         |
| II+DD                             | 100 | 15  |                           | DD+II                            | 98        | 14        |                                 |
| DD                                | 17  | 4   | 0,50 / 0,66 ( 0,19-2,24)  | II                               | 1         | 0         | 1,0 / 0,52 (0,02-13,24)         |
| II+ID                             | 96  | 14  |                           | DD + DI                          | 112       | 18        |                                 |

Tabela 14a(continuação). Análise de associação entre marcadores de ancestralidade e gravidade na esclerose múltipla.

| Marcadores              | <5 | ≥ 5 | p/OR (IC)                | Marcadores                   | <5        | ≥ 5      | p/OR (IC)                        |
|-------------------------|----|-----|--------------------------|------------------------------|-----------|----------|----------------------------------|
| <b>PV92 (rs3138523)</b> |    |     |                          | <b>MID-93 (rs16383)</b>      |           |          |                                  |
| II                      | 11 | 2   | 1 / 0,89 (0,18-4,43)     | DD                           | 9         | 4        | 0,09 / 0,32 (0,08-1,18)          |
| ID+DD                   | 98 | 15  |                          | DI + II                      | 104       | 14       |                                  |
| ID                      | 35 | 4   | 0,79 / 1,23 (0,40-3,72)  | DI                           | 49        | 8        | 1,0 / 1,05 (0,39-2,81)           |
| II+DD                   | 74 | 13  |                          | DD + II                      | 64        | 10       |                                  |
| DD                      | 63 | 11  | 1 / 0,87 (0,31-2,42)     | II                           | 55        | 6        | 0,45 / 1,62 (0,59-4,43)          |
| II + ID                 | 46 | 6   |                          | DD + DI                      | 58        | 12       |                                  |
| <b>LPL (rs285)</b>      |    |     |                          | <b>DRD2-BclI (rs1079598)</b> |           |          |                                  |
| TT                      | 39 | 3   | 0,11 / 2,81 (0,77-10,24) | TT                           | 6         | 0        | 0,59 / 2,35 (0,12-43,6)          |
| TC+CC                   | 74 | 15  |                          | TC + CC                      | 107       | 18       |                                  |
| TC                      | 53 | 12  | 0,13 / 0,40 (0,14-1,14)  | <b>TC</b>                    | <b>23</b> | <b>9</b> | <b>0,01** / 0,28 (0,10-0,78)</b> |
| TT+CC                   | 60 | 6   |                          | <b>TT + CC</b>               | <b>90</b> | <b>9</b> |                                  |
| CC                      | 21 | 3   | 1 / 1,21 (0,32-4,56)     | CC                           | 84        | 9        | 0,06 / 2,60 (0,96-7,05)          |
| TT+TC                   | 92 | 15  |                          | TT + TC                      | 29        | 9        |                                  |
| <b>RB1 (rs2252544)</b>  |    |     |                          | <b>CKM (rs4884)</b>          |           |          |                                  |
| CC                      | 20 | 2   | 1 / 1,14 (0,30-4,31)     | TT                           | 13        | 2        | 1 / 1,10 (0,22-5,34)             |
| CT+TT                   | 93 | 16  |                          | TC + CC                      | 100       | 16       |                                  |
| CT                      | 53 | 7   | 0,46 / 1,51 (0,55-4,12)  | TC                           | 45        | 5        | 0,31 / 1,85 (0,62-5,5)           |
| CC+TT                   | 60 | 11  |                          | TT + CC                      | 68        | 13       |                                  |
| TT                      | 40 | 9   | 0,31 / 0,60 (0,22-1,62)  | CC                           | 55        | 11       | 0,32 / 0,55 (0,2-1,5)            |
| CC+ CT                  | 73 | 9   |                          | TT + TC                      | 58        | 7        |                                  |

Tabela 15. Relação entre marcadores de ancestralidade e gravidade do primeiro surto estratificada, menor do que 5 e maior ou igual a 5, pela Escala de EDSS nos pacientes com esclerose múltipla.

| Marcadores                        | P    | OR   | IC         | Marcadores                          | P             | OR           | IC               |
|-----------------------------------|------|------|------------|-------------------------------------|---------------|--------------|------------------|
| <b><i>FY-null (rs2814778)</i></b> |      |      |            | <b><i>APOA1 (rs3138522)</i></b>     |               |              |                  |
| AA                                | 0,91 | 1,06 | 0,35-3,23  | II                                  | 0,3           | 1,76         | 0,60-5,16        |
| AG                                | 0,92 | 0,94 | 0,28-3,13  | ID                                  | 0,31          | 0,55         | 0,17-1,74        |
| GG                                | 0,96 | 0,95 | 0,10-8,40  | <b>DD</b>                           | 0,83          | 0,78         | 0,08-7,15        |
| <b><i>AT3 (rs23138521)</i></b>    |      |      |            | <b><i>MID-52 (rs16344)</i></b>      |               |              |                  |
| II                                | 0,45 | 2,21 | 0,27-18,00 | DD                                  | <b>0,03**</b> | <b>3,03</b>  | <b>1,09-8,35</b> |
| ID                                | 0,08 | 0,4  | 0,14-1,12  | DI                                  | <b>0,01**</b> | <b>0,27</b>  | <b>0,09-0,76</b> |
| DD                                | 0,2  | 1,96 | 0,69-5,59  | II                                  | 0,98          | >999,99      | <0,0001->999,99  |
| <b><i>SB19.3 (rs3138524)</i></b>  |      |      |            | <b><i>MID-575 (rs140864)</i></b>    |               |              |                  |
| II                                | 0,29 | 1,73 | 0,61-4,90  | DD                                  | 0,38          | 1,73         | 0,50-5,93        |
| ID                                | 0,53 | 0,65 | 0,16-2,55  | DI                                  | 0,32          | 0,53         | 0,15-1,84        |
| DD                                | 0,44 | 0,62 | 0,18-2,11  | II                                  | 0,99          | >999,99      | <0,001->999,99   |
| <b><i>PV92 (rs3138523)</i></b>    |      |      |            | <b><i>MID-93 (rs16383)</i></b>      |               |              |                  |
| II                                | 0,83 | 0,84 | 0,17-4,17  | DD                                  | 0,07          | 0,3          | 0,008-1,11       |
| ID                                | 0,47 | 1,53 | 0,46-5,05  | DI                                  | 0,93          | 0,95         | 0,35-2,60        |
| DD                                | 0,59 | 0,74 | 0,25-2,16  | II                                  | 0,23          | 1,89         | 0,66-5,40        |
| <b><i>LPL (rs285)</i></b>         |      |      |            | <b><i>DRD2-BclI (rs1079598)</i></b> |               |              |                  |
| TT                                | 0,14 | 2,63 | 0,71-9,65  | TT                                  | 0,97          | >999,99      | <0,001- >999,99  |
| TC                                | 0,12 | 0,44 | 0,15-1,25  | TC                                  | <b>0,01**</b> | <b>0,256</b> | <b>0,09-0,71</b> |
| CC                                | 0,84 | 1,14 | 0,30-4,30  | CC                                  | <b>0,04**</b> | <b>2,89</b>  | <b>1,04-7,99</b> |
| <b><i>RB1 (rs2252544)</i></b>     |      |      |            | <b><i>CKM (rs4884)</i></b>          |               |              |                  |
| CC                                | 0,49 | 1,72 | 0,36-8,08  | TT                                  | 0,96          | 1,04         | 0,21-5,04        |
| CT                                | 0,52 | 1,38 | 0,50-3,83  | TC                                  | 0,33          | 1,72         | 0,57-5,15        |
| TT                                | 0,23 | 0,54 | 0,20-1,49  | CC                                  | 0,33          | 0,6          | 0,21-1,66        |

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol*. 2006;19(3):248-254.
2. Papais-Alvarenga RM, Vasconcelos CC, Carra A, et al. Central Nervous System Idiopathic Inflammatory Demyelinating Disorders in South Americans: A Descriptive, Multicenter, Cross-Sectional Study. *PLoS One*. 2015;10(7):e0127757.
3. Tintore M, Rovira À, Río J, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138(Pt 7):1863-1874.
4. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(20):1430-1438.
5. Damasceno A, Von Glehn F, Brandão CO, Damasceno BP, Cendes F. Prognostic indicators for long-term disability in multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci*. 2013;324(1-2):29-33.
6. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1452.
7. Scafari A, Neuhaus A, Degenhardt A, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*. 2010;133(Pt 7):1914-1929.
8. Ebers GC, Koopman WJ, Hader W, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: 8: familial multiple sclerosis. *Brain*. 2000;123 Pt 3:641-649.
9. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1638-1642.
10. Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol*. 2016;36(2):103-114.
11. Hedström AK, Alfredsson L, Olsson T. Environmental factors and their interactions with risk genotypes in MS susceptibility. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(3):293-298.
12. Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, et al. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2011;8:127.
13. Oksenberg JR BL, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, Lincoln RR, Swerdlin A, Mignot E, Lin L, Goodin D, Erlich HA, Schmidt S, Thomson G, Reich DE, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet* 2004;1:160-167.
14. Kira J KT, Nishimura Y, Yamasaki K, Matsushita S, Kawano Y, Hasuo K, Tobimatsu S, Kobayashi T. Western versus Asian types of multiple sclerosis: immunogenetically and clinically distinct disorders. *Ann Neurol*. 1996;40:569-574.
15. Brum DG, Barreira AA, Louzada-Junior P, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Association of the HLA-DRB1\*15 allele group and the DRB1\*1501 and DRB1\*1503 alleles with multiple sclerosis in White and Mulatto samples from Brazil. *J Neuroimmunol*. 2007;189(1-2):118-124.
16. Alves-Leon SV P-AR, Magalhães M, Alvarenga M, Thuler LC, Fernández y Fernandez O. Ethnicity- dependent association of HLA DRB1-DQA1- DQB1 alleles in Brazilian multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2007;115:306-311.
17. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-219.
18. Atlas of MS. 2013; Prevalence by country. Available at: [www.atlasofms.org](http://www.atlasofms.org).
19. Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand*. 2001;104(4):208-213.

20. Ferreira ML, Machado MI, Vilela ML, et al. [Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(4):1027-1032.
21. Granieri E, Tola R, Paolino E, Rosati G, Carreras M, Monetti VC. The frequency of multiple sclerosis in Italy: a descriptive study in Ferrara. *Ann Neurol*. 1985;17(1):80-84.
22. Rosati G. Descriptive epidemiology of multiple sclerosis in Europe in the 1980s: a critical overview. *Ann Neurol*. 1994;36 Suppl 2:S164-174.
23. IBGE. Síntese dos indicadores- 2006. IBGE- Instituto de Geografia e Estatística: IBGE\_Rio de Janeiro; 2006.
24. Brum DG, Luizon MR, Santos AC, et al. European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. *PLoS One*. 2013;8(3):e58925.
25. Parra EJ, Marcini A, Akey J, et al. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet*. 1998;63(6):1839-1851.
26. Shriver MD, Parra EJ, Dios S, et al. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet*. 2003;112(4):387-399.
27. Luizon MR, Mendes-Junior CT, De Oliveira SF, Simões AL. Ancestry informative markers in Amerindians from Brazilian Amazon. *Am J Hum Biol*. 2008;20(1):86-90.
28. Shriver MD, Smith MW, Jin L, et al. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet*. 1997;60(4):957-964.
29. Price AL, Patterson N, Yu F, et al. A genomewide admixture map for Latino populations. *Am J Hum Genet*. 2007;80(6):1024-1036.
30. Bachelierie F B-BA, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology.[corrected].LXXXIX.Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Vol 662013.
31. Terence J. Hadley Z-hL, Kazimiera Wasniowska,Alvin W Martin,Stephen C Peiper,Joseph Hesseigesser,Richard Horuk. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J Clin Invest*. 1994;94:985–991.
32. Stephen C. Peiper Z-xW, Kuldeep Neote,, Alvin W. Martin HJS, Maryrose J. Conklyn,, Kevin Ogborne TJH, Zhao-hai Lu,, Joseph Hesselgesser RH. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med*. 1995;181:1311–1317.
33. Pogo AO, Chaudhuri A. Duffy and receptors for *P. vivax* and chemotactic peptides. *Transfus Clin Biol*. 1995;2(4):269-276.
34. Horuk R CC, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. A receptor for the malarial parasite plasmodium vivax: The erythrocyte chemokine receptor *Science*. 1993;261:1182-1184.
35. Horuk R MA, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H, Lu Z, Hesselgesser J, Perez HD, Kim J, Parker J, Hadley TJ, Peiper SC. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol*. 1997;158:2882-2890.
36. Langhi DM Jr BJ. Duffy blood group and malaria. *Hematolgy*. 2006;11:389-398.
37. Tournamille C CY, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the *Duffy* gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nature Genetics*. 1995;10:224 - 228.
38. Asok Chaudhuri JP, Valerie Zbrzezna, Kenneth Williams, Subhash Gulati, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood

- group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. PNASProc. Natl. Acad. Sci.1993.
39. Pogo AO CA. The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. Semin Hematol. 2000;37:122-129.
  40. Minten C, Alt C, Gentner M, et al. DARC shuttles inflammatory chemokines across the blood-brain barrier during autoimmune central nervous system inflammation. Brain. 2014;137(Pt 5):1454-1469.
  41. Reich D NM, Kao WH, Akyzbekova EL, Tandon A, Patterson N, Mullikin J, Hsueh WC, Cheng CY, Coresh J, Boerwinkle E, Li M, Waliszewska A,Neubauer J, Li R, Leak TS, Ekunwe L, Files JC, Hardy CL, Zmuda JM, Taylor HA, Ziv E, Harris TB, Wilson JG. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. PLoS Genet. 2009;5.
  42. Howes RE, Patil AP, Piel FB, et al. The global distribution of the Duffy blood group. Nat Commun. 2011;2:266.
  43. Luxembourg B, Delev D, Geisen C, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency. Thromb Haemost. 2011;105(4):635-646.
  44. Borg JY, Owen MC, Soria C, Soria J, Caen J, Carrell RW. Proposed heparin binding site in antithrombin based on arginine 47. A new variant Rouen-II, 47 Arg to Ser. J Clin Invest. 1988;81(4):1292-1296.
  45. Okajima K, Abe H, Maeda S, et al. Antithrombin III Nagasaki (Ser116-Pro): a heterozygous variant with defective heparin binding associated with thrombosis. Blood. 1993;81(5):1300-1305.
  46. Baud O, Picard V, Durand P, et al. Intracerebral hemorrhage associated with a novel antithrombin gene mutation in a neonate. J Pediatr. 2001;139(5):741-743.
  47. Kobayashi J, Mabuchi H. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. Ann Clin Biochem. 2015;52(Pt 6):632-637.
  48. Xu X, Wang X, Todd EM, et al. Mst1 Kinase Regulates the Actin-Bundling Protein L-Plastin To Promote T Cell Migration. J Immunol. 2016;197(5):1683-1691.
  49. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. Nat Genet. 2008;40(2):161-169.
  50. Kathiresan S, Melander O, Anevski D, et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. N Engl J Med. 2008;358(12):1240-1249.
  51. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. Nat Genet. 2009;41(1):47-55.
  52. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. Nature. 2010;466(7307):707-713.
  53. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. Nat Genet. 2013;45(11):1274-1283.
  54. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. Nature. 2009;461(7265):747-753.
  55. Wilson DE, Emi M, Iverius PH, et al. Phenotypic expression of heterozygous lipoprotein lipase deficiency in the extended pedigree of a proband homozygous for a missense mutation. J Clin Invest. 1990;86(3):735-750.
  56. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease. J Clin Invest. 1997;99(7):1606-1613.
  57. Clee SM, Bissada N, Miao F, et al. Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. J Lipid Res. 2000;41(4):521-531.
  58. Esteve E, Ricart W, Fernández-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. Clin Nutr. 2005;24(1):16-31.

59. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood*. 2001;97(8):2381-2389.
60. Burger D, Dayer JM. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev*. 2002;1(1-2):111-117.
61. Lettre G, Palmer CD, Young T, et al. Genome-wide association study of coronary heart disease and its risk factors in 8,090 African Americans: the NHLBI CARE Project. *PLoS Genet*. 2011;7(2):e1001300.
62. Rusciano G, Pesce G, Zito G, et al. Insights into the interaction of the N-terminal amyloidogenic polypeptide of ApoA-I with model cellular membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(4):795-801.
63. Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun*. 2010;24(4):525-528.
64. Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12912-12916.
65. Dijkstra CD, van der Voort ER, De Groot CJ, et al. Therapeutic effect of the D2-dopamine agonist bromocriptine on acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Psychoneuroendocrinology*. 1994;19(2):135-142.
66. Bałkowiec-Iskra E, Kurkowska-Jastrzebska I, Joniec I, et al. MPTP-induced central dopamine depletion exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL mice. *Inflamm Res*. 2007;56(8):311-317.
67. O'Sullivan D, Green L, Stone S, et al. Treatment with the antipsychotic agent, risperidone, reduces disease severity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2014;9(8):e104430.
68. Lieberknecht V, Junqueira SC, Cunha MP, et al. Pramipexole, a Dopamine D2/D3 Receptor-Preferring Agonist, Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Development in Mice. *Mol Neurobiol*. 2016.
69. Popovic M, Stanojevic Z, Tosic J, et al. Neuroprotective arylpiperazine dopaminergic/serotonergic ligands suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Neurochem*. 2015;135(1):125-138.
70. Comings DE, Comings BG, Muhleman D, et al. The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *JAMA*. 1991;266(13):1793-1800.
71. Vink M, de Leeuw M, Luykx JJ, et al. DRD2 Schizophrenia-Risk Allele Is Associated With Impaired Striatal Functioning in Unaffected Siblings of Schizophrenia Patients. *Schizophr Bull*. 2015.
72. Klein C, Brin MF, Kramer P, et al. Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):5173-5176.
73. Zai CC, Ehteshami S, Choi E, et al. Dopaminergic system genes in childhood aggression: possible role for DRD2. *World J Biol Psychiatry*. 2012;13(1):65-74.
74. Müller DJ, Zai CC, Sicard M, et al. Systematic analysis of dopamine receptor genes (DRD1-DRD5) in antipsychotic-induced weight gain. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(2):156-164.
75. Rowland BD, Bernards R. Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell*. 2006;127(5):871-874.
76. Santos M, Martínez-Fernández M, Dueñas M, et al. In vivo disruption of an Rb-E2F-Ezh2 signaling loop causes bladder cancer. *Cancer Res*. 2014;74(22):6565-6577.
77. Scott MC, Sarver AL, Tomiyasu H, et al. Aberrant Retinoblastoma (RB)-E2F Transcriptional Regulation Defines Molecular Phenotypes of Osteosarcoma. *J Biol Chem*. 2015;290(47):28070-28083.

78. Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, et al. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *N Engl J Med.* 1989;321(25):1689-1695.
79. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121-127.
80. Ota M, Asamura H, Oki T, Sada M. Restriction enzyme analysis of PCR products. *Methods Mol Biol.* 2009;578:405-414.
81. Cree BA, Khan O, Bourdette D, et al. Clinical characteristics of African Americans vs Caucasian Americans with multiple sclerosis. *Neurology.* 2004;63(11):2039-2045.
82. Ferreira Vasconcelos CC, Cruz Dos Santos GA, Thuler LC, Camargo SM, Papais Alvarenga RM. African ancestry is a predictor factor to secondary progression in clinical course of multiple sclerosis. *ISRN Neurol.* 2012;2012:410629.
83. Banwell B, Ghezzi A, Bar-Or A, Mikaeloff Y, Tardieu M. Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. *Lancet Neurol.* 2007;6(10):887-902.
84. Tremlett H, Devonshire V. Is late-onset multiple sclerosis associated with a worse outcome? *Neurology.* 2006;67(6):954-959.
85. Roohani P, Emiru T, Carpenter A, et al. Late onset multiple sclerosis: Is it really late onset? *Mult Scler Relat Disord.* 2014;3(4):444-449.
86. Foster E, Tsang BK, Skibina O, Kam A, Storey E. Case report of multiple sclerosis diagnosis in an 82-year old male. *Mult Scler Relat Disord.* 2014;3(3):413-415.
87. Renoux C, Vukusic S, Confavreux C. The natural history of multiple sclerosis with childhood onset. *Clin Neurol Neurosurg.* 2008;110(9):897-904.
88. Kis B, Rumberg B, Berlit P. Clinical characteristics of patients with late-onset multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008;255(5):697-702.
89. Swanton J, Fernando K, Miller D. Early prognosis of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:371-391.
90. Confavreux C, Aimard G, Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain.* 1980;103(2):281-300.
91. Held U, Heigenhauser L, Shang C, Kappos L, Polman C, Research SLCfM. Predictors of relapse rate in MS clinical trials. *Neurology.* 2005;65(11):1769-1773.
92. Bentley AR, Chen G, Shriner D, et al. Gene-based sequencing identifies lipid-influencing variants with ethnicity-specific effects in African Americans. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004190.
93. Basu S, Dasgupta PS. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol.* 2000;102(2):113-124.
94. Esquifino AI, Cano P, Zapata A, Cardinali DP. Experimental allergic encephalomyelitis in pituitary-grafted Lewis rats. *J Neuroinflammation.* 2006;3:20.
95. Charan A, Shewade DG, Rajkumar RP, Chandrasekaran A. Relation between serum prolactin levels and antipsychotic response to risperidone in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2016;240:209-213.
96. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* 1976;295(6):302-304.
97. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, et al. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol.* 1998;103(4):1184-1191.
98. Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kajii E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood.* 1996;87(1):378-385.

99. Reich D, Nalls MA, Kao WH, et al. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet.* 2009;5(1):e1000360.
100. Browne P, Chandraratna D, Angood C, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology.* 2014;83(11):1022-1024.
101. Finkelsztejn A, Lopes JS, Noal J, Finkelsztejn JM. The prevalence of multiple sclerosis in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72(2):104-106.
102. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011;6(2):e17063.
103. Naismith RT, Trinkaus K, Cross AH. Phenotype and prognosis in African-Americans with multiple sclerosis: a retrospective chart review. *Mult Scler.* 2006;12(6):775-781.

## **Capítulo II**

**Title: Atypical chemokine receptor 1 (ACKR1) gene is associated with resistance to multiple sclerosis**

Renata Brant de Souza Melo (1), Doralina Guimarães Brum(1)

(1) Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, Faculdade de Medicina de Botucatu Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

**Correspondence:** Doralina Guimarães Brum, Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo 18618-970, Brasil; e-mail: doralinagbrum@gmail.com

## 1. INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is the primary demyelinating disease of the central nervous system (CNS)<sup>1</sup>. MS has high prevalence in the Caucasian populations but is rare in the African populations<sup>2</sup>. Typically, MS lesions include breakdown of the blood-brain barrier (BBB), multifocal inflammation, demyelination, oligodendrocyte loss, reactive gliosis, and axonal degeneration<sup>3</sup>. Relevant aspects of the MS pathophysiology have been inferred from studies of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) using animal model<sup>4</sup>. MS is believed to be initiated when myelin-specific T cells infiltrate the CNS across the blood-brain barrier triggering subsequent recruitment of inflammatory leukocytes. Other immune cells such as B cells and neutrophils also play a role in MS pathogenicity<sup>5</sup>. However, T-cell trafficking and migration into the brain and their role and interaction with immune cells remain poorly understood. BBB breakdown is a consistent early feature of new lesion development in relapsing-remitting MS, and it usually correlates with active inflammation and myelin breakdown. During this process, vascular endothelial cells are affected leading to the opening of the BBB, which facilitates invasion of circulating inflammatory cells that play a critical role in the MS pathogenesis. Some proteins have been associated with BBB dysfunction<sup>6</sup>.

Even though the etiology of MS is unknown, the involvement of genetic-susceptibility and environmental determinants is well-acknowledged<sup>7</sup>. Refinements in genomic techniques and large-scale use of genetic markers in large population samples have enabled the identification of more than 100 genes associated with MS, many of which implicated in the control of immune responses<sup>8</sup>. However, few studies have investigated the association between genetic markers and BBB dysfunction mediated by proteins.

Recently, a study of induced EAE using Duffy atypical receptor chemokine (DARC) knockout mice demonstrated a potential role for DARC in BBB breakdown<sup>9</sup>. The DARC gene is also known as FY, Duffy (Dfy), and ACKR1<sup>10</sup>. ACKR1 encodes a glycosylated membrane protein and a promiscuous chemokine receptor that binds chemokines of both CXC (IL8) and CC (CCL5) classes, suggesting that it has role in inflammation<sup>12</sup>. In addition, ACKR1 polymorphisms are the basis of the Duffy blood group system<sup>11</sup>, which

consists of four alleles – FYA, FYB, FYB(ES), and FYB(WK), five antigens – Fy(a), Fy(b), Fy3, Fy5, and Fy6, and five phenotypes – Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+), Fy(a-b+(wK)), and Fy(a-b-). Fy(a-b-)<sup>13</sup>, or Duffy-negative individuals, lack the Duffy protein on erythrocytes and are predominantly African and American blacks<sup>14</sup>. The Fy(a-b-) phenotype has been classically associated with a mutated GATA box or the translated protein, which abolishes the expression of the protein in erythrocytes and characterizes Duffy-null individuals<sup>15</sup>. Additionally, immunohistochemical, biochemical, and molecular analysis of tissues from Duffy-negative individuals showed that ACKR1 is expressed in endothelial cells lining on the postcapillary venules lacking the erythrocyte receptor<sup>14</sup>.

The single-nucleotide polymorphism (SNP) Fy Null rs2814778 allele has unique worldwide distribution as shown on the geostatistical map in Figure 1b<sup>16</sup>. In a previous study from our group, Fy Null rs2814778 was evaluated as part of an ancestry informative marker (AIM) panel that was able to discriminate among populations of European, African, and Amerindian ancestry. The AIM panel was applied to compare MS, neuromyelitis optica (NMO), and healthy control groups<sup>17</sup>. The study showed by admixture mapping and principal component analysis (PCA) that MS, NMO, and controls all had European contribution. Considering the unique composition of the Brazilian population, this exploratory study aimed to investigate a possible association between the SNP marker Fy Null rs2814778 and MS.

## **OBJECTIVE**

This study aimed to determine the frequency of the Fy Null rs2814778 allele in MS individuals and healthy controls.

## **METHODS**

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School, São Paulo, Brazil under protocol 4205-2012. In total, 131 patients with MS diagnosed according to the McDonald criteria who were treated at the Clinical Hospital of the Ribeirão Preto School of Medicine,

Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil and 131 bone marrow donors with no personal or family history of autoimmune or demyelinating diseases recruited from the Ribeirão Preto Blood Center participated in the study.

Previous studies from our research group with the same patients that participated in the current study detected 12 AIMs with  $\delta$  values  $> 50\%$  between Africans and Europeans or Amerindians and Europeans<sup>18,19</sup>. Here, we evaluated the same AIMs using PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP)<sup>17</sup>.

### Statistical analysis

Patients were stratified by age of MS onset and severity of first attack and 2 x 2 contingency tables were constructed for the comparison of allelic frequencies using the Fisher's exact test with odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI). The analyses were performed using GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

## RESULTS

Thirty-six men and 67 women were evaluated (F/M ratio: 2.1). The median age of MS onset was 30 years (range: 13–59 years) and the median Kurtzke *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) in the last evaluation was 6.0 (range: 1.0–10.0).

Analysis of the AIM panel showed that heterozygosis frequency was lower in MS patients than in controls for FY-Null polymorphisms A/G rs2814778 (OR = 0.44, 95% CI = 0.24–0.82,  $p = 0.01$ ) and AT3 ins/del rs138521 (OR = 0.44, 95% CI = 0.25–0.77,  $p = 0.004$ ) (Table 1).

Table 1. Ancestry informative markers and the risk for developing MS.

| Ancestry marker  | p     | OR (95% CI)      |
|------------------|-------|------------------|
| rs2814778 AG     | 0.01  | 0.44 (0.24–0.82) |
| rs2252544 TC     | 0.962 | 1.01 (0.58–1.77) |
| rs285 TC         | 0.766 | 1.09 (0.63–1.89) |
| rs3138521 InsDel | 0.004 | 0.44 (0.25–0.77) |
| rs3138524 InsDel | 0.12  | 0.56 (0.27–1.17) |
| rs3138522 InsDel | 0.535 | 1.28 (0.59–2.78) |
| Rs3138523 InsDel | 0.193 | 0.69 (0.39–1.21) |
| rs4884 TC        | 0.194 | 0.69 (0.39–1.21) |
| rs1079598 TC     | 0.601 | 1.19 (0.62–2.32) |
| rs16383 InsDel   | 0.351 | 1.31 (0.74–2.31) |
| rs16344 InsDel   | 0.296 | 0.72 (0.39–1.33) |
| Rs140864 InsDel  | 0.443 | 0.72 (0.31–1.66) |
| Constant         | 0.005 | 2.9              |

## DISCUSSION

The Fy Null G/G rs2814778 genotype is known to be associated with impaired gene expression in erythroid from DARC-negative individuals<sup>15</sup>, resistance to *Plasmodium falciparum* malaria (PF)<sup>20</sup>, and benign neutropenia in Africans<sup>21</sup>. Additionally, an *in vitro* study demonstrated another role for DARC (or ACKR1) erythrocyte as a chemokine reservoir<sup>9</sup>. In our study, an MS protective effect was observed in the heterozygous genotype FY-null T/G rs2814778 when compared to controls, indicating another possible association for the gene.

The Fy Null G rs2814778 allele and the Fy Null G/G rs2814778 genotype, and the Fy Null T rs2814778 allele and the Fy Null T/T rs2814778 genotype show differential worldwide distribution<sup>16</sup>. The former are predominant in West Africa and have low frequency in Europe, North America, and Asia, whereas the latter exhibit low frequency in Africa and almost 100% in Caucasian individuals. The Brazilian sample analyzed in the current study showed 52% heterozygosity - Fy Null G/T rs3814778, reflecting the admixture

of Europeans and Africans in the Brazilian population. Interestingly, the worldwide distribution of Fy Null is mirrored by the distribution of MS prevalence – MS has high prevalence in Europe and North America (> 100/100,000 population) and is rare in Africa, regions with low and high frequency of the Fy Null G allele, respectively<sup>1</sup> (Fig. 1b). Thus, the association of Fy Null T/G genotype with MS protection in a Brazilian population sample suggests that this polymorphism may play a role in resistance to disease development<sup>22</sup>. This interpretation is supported by an experimental study that showed mild clinical signs of EAE in the BBB endothelium of DARC-deficient mice (C57BL/6 Darc<sup>-/-</sup> and SJL Darc<sup>-/-</sup>)<sup>9</sup>. Thus, if i) Afro-descendants are DARC-deficient<sup>15</sup>, ii) MS is rare in DARC-deficient African regions<sup>2,16</sup>, and iii) DARC-deficient mice with induced EAE show mild clinical manifestations<sup>9</sup>, this molecule may be associated with protection against MS and EAE and milder relapse. Interestingly, inflammatory cell infiltrates in postcapillary venules – the same site of ACKR1 expression – are the hallmark of MS<sup>23</sup>. Nevertheless, no ACKR1 expression was observed in arterial endothelial cells<sup>24</sup>.

In Brazil, the prevalence of MS ranges from low (1.3/100,000, Recife, state of Pernambuco, Northeast region) to moderate (27/100,000, Santa Maria, state of Rio Grande do Sul, South region) and shows a north-south gradient<sup>25,26</sup>. Most European contribution to the genetic composition of the Brazilian population also follows the same pattern within the country. Thus, the association of genotype Fy Null G/T with MS protection could help explain the low MS prevalence in Afro-descendant populations. Frequency studies of Fy Null alleles in different Brazilian regions may help explain the distribution of MS in Brazil. It is possible that the association of ACKR1 with MS had never been detected because most studies have been conducted in Caucasian populations, in which the Fy null A/A rs2814778 genotype has high frequency. The analysis of the risk of MS also showed that AT3 ins/del rs138521 heterozygosity rate was also reduced. The association of SNPs rs2814778 and rs138521 with MS protection may simply reflect linkage disequilibrium between the two markers, which has been previously demonstrated<sup>19</sup>.

## CONCLUSION

Genetic markers with specific allele population profiles can influence MS prevalence and help explain some trends in disease prevalence across different populations. ACKR1 is a genetic trait associated with resistance to MS and may influence the pathophysiology of MS.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> NOSEWORTHY, J. H. et al. Multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 343, n. 13, p. 938-52, Sep 2000. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006371> >.
- <sup>2</sup> BROWNE, P. et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, v. 83, n. 11, p. 1022-4, Sep 2014. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25200713> >.
- <sup>3</sup> TRAPP, B. D. et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 338, n. 5, p. 278-85, Jan 1998. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445407> >.
- <sup>4</sup> STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 60, n. 1, p. 12-21, Jul 2006. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16802293> >.
- <sup>5</sup> SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 683-747, 2005. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking).
- <sup>6</sup> WOLBURG, H. et al. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. **Acta Neuropathol**, v. 105, n. 6, p. 586-92, Jun 2003. ISSN 0001-6322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734665> >.
- <sup>7</sup> GOODIN, D. S. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade. **Handb Clin Neurol**, v. 138, p. 173-206, 2016. ISSN 0072-9752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27637959> >.
- <sup>8</sup> SAWCER, S. et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. **Nature**, v. 476, n. 7359, p.

214-9, Aug 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833088> >.

- 9 MINTEN, C. et al. DARC shuttles inflammatory chemokines across the blood-brain barrier during autoimmune central nervous system inflammation. **Brain**, v. 137, n. Pt 5, p. 1454-69, May 2014. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625696> >.
- 10 BACHELERIE, F. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 1, p. 1-79, 2014. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24218476> >.
- 11 CUTBUSH, M.; MOLLISON, P. L. The Duffy blood group system. **Heredity (Edinb)**, v. 4, n. 3, p. 383-9, Dec 1950. ISSN 0018-067X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14802995> >.
- 12 LEE, J. S. et al. Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo. **J Immunol**, v. 170, n. 10, p. 5244-51, May 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734373> >.
- 13 TOURNAMILLE, C. et al. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. **Hum Genet**, v. 95, n. 4, p. 407-10, Apr 1995. ISSN 0340-6717. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705836> >.
- 14 PEIPER, S. C. et al. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. **J Exp Med**, v. 181, n. 4, p. 1311-7, Apr 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7699323> >.
- 15 TOURNAMILLE, C. et al. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nat Genet**, v. 10, n. 2, p. 224-8, Jun 1995. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7663520> >.
- 16 HOWES, R. E. et al. The global distribution of the Duffy blood group. **Nat Commun**, v. 2, p. 266, 2011. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468018> >.
- 17 BRUM, D. G. et al. European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58925, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527051> >.

- 18 LUIZON, M. R. et al. Ancestry informative markers in Amerindians from Brazilian Amazon. **Am J Hum Biol**, v. 20, n. 1, p. 86-90, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 1042-0533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17963227> >.
- 19 SHRIVER, M. D. et al. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **Am J Hum Genet**, v. 60, n. 4, p. 957-64, Apr 1997. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106543> >.
- 20 MILLER, L. H. et al. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **N Engl J Med**, v. 295, n. 6, p. 302-4, Aug 1976. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/778616> >.
- 21 REICH, D. et al. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. **PLoS Genet**, v. 5, n. 1, p. e1000360, Jan 2009. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180233> >.
- 22 PONOMARENKO, M. P. et al. Candidate SNP Markers of Gender-Biased Autoimmune Complications of Monogenic Diseases Are Predicted by a Significant Change in the Affinity of TATA-Binding Protein for Human Gene Promoters. **Front Immunol**, v. 7, p. 130, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27092142> >.
- 23 RAE-GRANT, A. D. et al. Observations on the brain vasculature in multiple sclerosis: A historical perspective. **Mult Scler Relat Disord**, v. 3, n. 2, p. 156-62, Mar 2014. ISSN 2211-0356. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25878003> >.
- 24 HADLEY, T. J.; PEIPER, S. C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v. 89, n. 9, p. 3077-91, May 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129009> >.
- 25 FERREIRA, M. L. et al. [Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, n. 4, p. 1027-32, Dec 2004. ISSN 0004-282X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608964> >.
- 26 FINKELSZTEJN, A. et al. The prevalence of multiple sclerosis in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 72, n. 2, p. 104-6, Feb 2014. ISSN 1678-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24604362> >.

