



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

THIAGO HISSNAUER LEAL BALTUS

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO  $\Delta 32$  (rs333)  
DO *RECEPTOR DE QUIMIOCINA 5* EM PACIENTES COM  
LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO ATENDIDOS EM  
LONDRINA, PARANÁ**

THIAGO HISSNAUER LEAL BALTUS

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO  $\Delta 32$  (rs333)  
DO *RECEPTOR DE QUIMIOCINA 5* EM PACIENTES COM  
LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO ATENDIDOS EM  
LONDRINA, PARANÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B197a Baltus, Thiago Hissnauer Leal.

Avaliação do polimorfismo genético  $\Delta 32$  (rs333) do receptor de *quimiocina 5* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico atendidos em Londrina, Paraná / Thiago Hissnauer Leal Baltus. – Londrina, 2014.  
119 f. il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Lúpus eritematoso sistêmico – Teses. 2. Polimorfismo (Genética) – Teses. 3. Citocinas – Teses. 4. Imunidade celular – Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.5-002.525.2

THIAGO HISSNAUER LEAL BALTUS

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO  $\Delta 32$  (rs333) DO  
*RECEPTOR DE QUIMIOCINA 5* EM PACIENTES COM LUPUS  
ERITEMATOSO SISTÊMICO ATENDIDOS EM LONDRINA, PARANÁ**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci  
Reiche  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Karen Bração de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2014.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo dom da vida, e por todas as coisas e pessoas boas que Ele colocou em meu caminho;

Agradeço muito à Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, por toda paciência, dedicação e fé depositadas em mim. Agradeço por não ter sido somente minha orientadora, mas por também ter atuado como professora, intercessora, amiga e mãe;

Agradeço aos professores Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida, Dra. Andréa Name Colado Simão, Msc. Helena Kaminami Morimoto, Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy, por ensinarem, ouvirem, aconselharem, guiarem, por se desdobrarem a ajudar no que fosse possível quando lhes eram solicitados;

Agradeço aos colegas de pós-graduação do Setor de Diagnóstico Molecular do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Hospital Universitário da UEL, em especial à Francielli Delongui, que fora minha “dupla” nas atividades do dia-a-dia no laboratório, sempre organizada e preocupada com a qualidade de nosso trabalho; e também à Ana Paula Kallaur, que sempre se empenhou, com muito esforço e paciência, a me ensinar, me ajudar, me entender, e que contribuiu demais para a conclusão deste trabalho;

Agradeço à Secretaria de Pós-Graduação, pelo excelente trabalho e zelo não só comigo, mas para com todos os alunos, especialmente à secretária Sandra Lage e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do CCS da UEL, Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa;

Agradeço à Fundação CAPES, pela grande contribuição em patrocinar este estudo, ou melhor, este pesquisador, com uma bolsa de estudos, fundamental para meu estabelecimento em Londrina;

Agradeço a toda equipe do Hospital Universitário e do Hemocentro Regional de Londrina que, de várias maneiras, contribuíram para o bom andamento e conclusão deste trabalho, e de maneira especial, agradeço aos técnicos dos setores de Diagnóstico Molecular e de Imunologia Clínica do LAC, pela amizade, pelo bom convívio, por serem prestativos e sempre ajudarem de boa vontade;

À minha família, que mesmo na distância, esteve presente em todos os meus dias, em minha mente e meu coração. Minha mãe, Sônia Cristina Hissnauer Leal Baltus, meu pai, João Leo Baltus e minha irmã, Isabella Hissnauer Leal Baltus, sou incalculavelmente grato e feliz por tê-los em minha vida;

Agradeço aos amigos que, mais importante que apenas me apoiarem, mas me descontraíram e fizeram-me não pensar nos problemas e nas dificuldades, pessoas com quem encontrei alegria, compreensão e companhia. De maneira muito especial, agradeço a Alisson Kenji Tanaka, Eliane Yuka Kagueyama, Ana Claudia Mainardi, Mario Yoshiuki Utiamada, Wagner Tadashi Yamada, Eugênia Chirata Nunes, André Bacchi, Diogo Carraro, Gleyson Stabile, Bruna Bacchi, Marcos Antônio Galera da Silva Jr., Vandir Azevedo Mandolini, José Alexandre de Oliveira Pimentel, Luís Felipe Pimentel de Vicente, Thais Macedo, Rafael Coffi Tonnon, Dr. Fernando Spangenberg, Raul Alves da Silva Neto, Leonardo Correia e Pedro Henrique Villas Boas. A todos vocês sou grato, de coração, pelos bons momentos vividos nestes dois anos.

BALTUS, Thiago Hissnauer Leal. **Avaliação do polimorfismo genético  $\Delta 32$  (rs333) do receptor de quimiocina 5 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico atendidos em Londrina, Paraná.** 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, 2014.

## RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma desordem inflamatória crônica, autoimune sistêmica e de etiologia multifatorial. Caracterizado por ampla perda de tolerância imunológica a autoantígenos, com ativação do sistema imunológico, produção de autoanticorpos e formação de imunocomplexos. Variações em genes que regulam a expressão de citocinas podem desempenhar um importante papel na susceptibilidade, atividade e progressão da doença. Os objetivos deste estudo foram determinar a frequência do polimorfismo genético  $\Delta 32$  (rs333) do receptor de quimiocina 5 (*CCR5 $\Delta 32$* ) em pacientes com LES e em controles saudáveis e avaliar a associação entre este polimorfismo e as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES. Foram avaliadas 120 mulheres com LES atendidas no Ambulatório de Reumatologia do Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e 132 mulheres saudáveis atendidas no Hemocentro Regional de Londrina, controladas quanto à idade, etnia e índice de massa corpórea (IMC). Dados demográficos, antropométricos, clínicos e laboratoriais foram obtidos por consulta a prontuários e pelo banco de dados do Programa LABHOS do Hospital Universitário da UEL. A atividade da doença foi avaliada pelo Índice de Atividade de Doença (SLEDAI). O DNA genômico foi extraído de células do sangue periférico e o gene *CCR5* foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos. Entre as pacientes, 84,2% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5* e 15,8% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta 32$* ; entre os controles, 96,2% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5* e 3,8% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta 32$* . Diferenças significativas foram observadas em pacientes e controles portadoras do genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta 32$*  ( $p = 0,0012$ ; *odds ratio* (OR): 4,77; intervalo de confiança (IC) 95% 1,72 – 13,24), assim como nas portadoras do alelo *CCR5 $\Delta 32$*  ( $p = 0,0015$ ; OR: 4,45; IC 95% 1,65-12,20), indicando uma maior chance de desenvolvimento da doença quando comparadas com pacientes e controles do genótipo homocigoto selvagem. Entre as pacientes Caucásicas, 81,0% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5* e 19,0% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta 32$* . Entre as pacientes não Caucásicas, 90,2% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5* e 9,8% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta 32$* . Entre as mulheres saudáveis Caucásicas, 96,0% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5* e 4,0% apresentaram o genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta 32$* . Diferenças significativas também foram encontradas quando comparadas, entre pacientes e controles da etnia Caucásica, a frequência dos genótipos ( $p=0,0025$ ; OR: 5,56; IC 95% 1,76-17,54) e dos alelos ( $p=0,0032$ ; OR: 5,09; IC 95% 1,65-15,66). Em geral, as pacientes portadoras do genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta 32$*  apresentaram menor idade de início da doença ( $p=0,0032$ ), níveis mais elevados de leucócitos ( $p=0,0506$ ) e maior frequência de reatividade aos anticorpos anti-dsDNA ( $p=0,0484$ ) comparadas às

pacientes com o genótipo selvagem. Pacientes Caucasianas portadoras do genótipo *CCR5/CCR5Δ32* também apresentaram menor idade de início da doença ( $p=0,0276$ ), níveis mais elevados de leucócitos ( $p = 0,0471$ ) e maior frequência de reatividade aos anticorpos anti-dsDNA ( $p=0,0025$ ) comparadas às pacientes com o genótipo selvagem. Entre as pacientes não Caucasianas não foram observadas diferenças nas características clínicas e laboratoriais de acordo com os genótipos ( $p>0,05$ ). A menor expressão do *CCR5* na membrana das células das portadoras do alelo *CCR5Δ32* levaria a uma menor resposta inflamatória do padrão Th1 e, por consequência, a um maior envolvimento da resposta com padrão Th2 fortemente associada à resposta humoral autoimune, com produção aumentada de autoanticorpos anti-dsDNA, sugerindo uma evolução clínica mais grave. Os resultados sugerem que este polimorfismo está associado com a presença de LES em mulheres Caucasianas e que o genótipo *CCR5/CCR5Δ32* e o alelo *CCR5Δ32* conferem maior susceptibilidade ao LES e maior atividade da doença nestas pacientes.

**Palavras-chave:** Polimorfismo genético. Receptor de quimiocina 5. Lúpus eritematoso sistêmico. *CCR5Δ32*. Anti-dsDNA

BALTUS, Thiago Hissnauer Leal. **Evaluation of genetic polymorphism  $\Delta 32$  (rs333) of chemokine receptor 5 in systemic lupus erythematosus patients attended in Londrina, Paraná.** 2014. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina – 2014.

## ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory, autoimmune, systemic and of multifactorial etiology disorder. It is characterized by wide loss of immune tolerance to self-antigens, activation of immune system, production of self-antibodies and immune complexes formation. Gene variations that regulates the cytokines expression may play a role on susceptibility, activity and progression of disease. The objectives of this study were determinate the frequency of genetic polymorphism  $\Delta 32$  (rs333) of chemokine receptor 5 (CCR5) in SLE patients and healthy controls, and evaluate the association of this polymorphism and clinical and laboratorial features of patients. One hundred and twenty women with SLE were attended at Outpatient Rheumatology of Outpatient Clinical Hospital of State University of Londrina (UEL) and 132 healthy women from Blood Bank of Londrina, Paraná, Brazil, controlled by age, ethnicity, and body mass index (BMI) were enrolled in the study. Demographic, anthropometric, clinical, and laboratory data were obtained from hospital and laboratory database. Disease activity was assessed by SLE Disease Activity Index (SLEDAI). Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells and the CCR5 gene was amplified using polymerase chain reaction (PCR), using specific primers. Among SLE Caucasian patients, 64 (81.0%) presented the CCR5/CCR5 genotype and 15 (19.0%) the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype. Among patients, 84.2% presented the CCR5/CCR5 genotype and 15.8% the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype; among healthy controls, 96.2% presented the CCR5/CCR5 genotype and 3.8% the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype. Significant differences were found in patients and controls with the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype ( $p = 0.0012$ ; odds ratio (OR): 4.77; confidence interval (CI) 95% 1.72 – 13.24), as also seem in those carrying the CCR5 $\Delta 32$  allele ( $p = 0.0015$ ; OR: 4.45; CI 95% 1.65-12.20), with a higher probability for the development of SLE when compared with patients and controls with homozygous wild-type genotype. Among Caucasian patients, 81.0% presented the CCR5/CCR5 genotype and 19.0% presented the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype. Among non-Caucasian patients, 90.2% presented the CCR5/CCR5 genotype and 9.8% presented the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype. Among healthy Caucasian women, 96.0% presented the CCR5/CCR5 genotype and 4.0% presented the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype. Significant differences were also observed when compared, among Caucasian patients and controls, the genotype ( $p=0.0025$ ; OR: 5.56; CI 95% 1.76-17.54) and allele ( $p=0.0032$ ; OR: 5.09; IC 95% 1.65-15.66) frequency. Overall, the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype patients showed lower age of onset of disease ( $p=0.0032$ ), higher frequency of positive anti-dsDNA autoantibodies ( $p=0.0484$ ), and higher leukocyte counts ( $p=0.0506$ ), than those with the wild type genotype. Caucasian SLE patients carrying the CCR5/CCR5 $\Delta 32$  genotype also

showed lower age of onset of disease ( $p=0.0276$ ), higher frequency of positive anti-dsDNA autoantibodies ( $p=0.0025$ ), higher leukocyte counts ( $p=0.0471$ ), than those with the wild type genotype. Among the non-Caucasian SLE patients, no differences were observed on clinical and laboratory features according to the genotypes ( $p>0.05$ ). The decreased expression of CCR5 on cell surface of patients carrying *CCR5Δ32* allele would lead to a weaker inflammatory Th1 response and, consequently, lead to an higher involvement of Th2 response, strongly associated to humoral autoimmune response, with increased production of anti-dsDNA self-antibodies, suggesting a more severe disease development. The results suggest that this polymorphism is associated with the presence of SLE in Caucasian women, and the *CCR5/CCR5Δ32* genotype and *CCR5Δ32* allele confer higher susceptibility to disease and increased activity of disease in these patients.

**Key-words:** Genetic polymorphism. Chemokine receptor 5. Systemic lupus erythematosus. *CCR5Δ32*,.Anti-dsDNA

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
C	Citosina
BRAK	<i>Breast and kidney-expressed protein</i> – proteína expressa por mamas e rins
C1q	Componente do complemento 1 q
CCR5	Receptor de quimiocina 5
CCR5 $\Delta$ 32	Polimorfismo genético delta 32 do gene <i>CCR5</i>
CNV	<i>Copy number variations</i> – variações no número de cópias
CTACK	<i>Cutaneous T-cell attracting chemokine</i> – quimiocina cutânea atrativa de células T
DMC	<i>Dendritic cell and monocyte-attracting chemokine-like protein</i> – proteína de célula dendríticas e atrativa de monócito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	<i>Double-stranded DNA</i> - DNA de dupla fita
EBV	Epstein-Barr <i>virus</i> – vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENA	<i>Epithelial-derived neutrophil-activating peptide</i> – peptídeo derivado de epitélio ativador de neutrófilo
EUA	Estados Unidos da América
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> – Quinase de adesão focal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Guanina
GCP	<i>Granulocyte chemotactic protein</i> – proteína quimiotática de granulócito
GRO	<i>Growth regulated oncogene</i> – oncogene regulador de crescimento
HBc	Partícula do núcleo do vírus da hepatite B

HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> – Vírus da imunodeficiência humana
HCC	<i>Hemofiltrate C-C chemokines</i> – hemofiltrado de quimiocinas C-C
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> – Antígeno leucocitário humano
HTLV-I/II	<i>Human T lymphocyte virus type I/II</i> - vírus do linfócito T humano tipo I e II
HU	Hospital Universitário de Londrina
ICs	Imunocomplexos
IFN	Interferon
IFR5	<i>Interferon regulatory factor 5</i> – fator regulador de interferon 5
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IP	<i>Interferon gamma induced protein</i> – proteína indutora de interferon gama
IQR	<i>Interquartil range</i> – Intervalo de interquartil
I-TAC	<i>Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant</i> – quimioatrativo de célula T alfa induzido por interferon
LARC	<i>Liver activation regulated chemokine</i> – quimiocina regulada por ativação do fígado
LB	Linfócito B
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LT	Linfócito T
LTa	Linfotoxina alfa
MAP	<i>Mitogen activated protein kinase</i> – proteína kinase ativada por mitógeno
MCP	<i>Macrophage chemotactic protein</i> – proteína quimiotática de macrófago

MDC	<i>Macrophage derived chemokine</i> – quimiocina derivada de macrófago
MEC	<i>Mucosae associated epithelial chemokine</i> – quimiocina associada a mucosa epitelial
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> – complexo principal de histocompatibilidade
MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon</i> – monocina induzida por interferon gama
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> – proteína inflamatória de macrófago
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> – Fator nuclear <i>kappa B</i>
OR	<i>Odds ratio</i> – razão de chance
PARC	<i>Pulmonar activation regulated chemokine</i> – quimiocina regulada por ativação pulmonar
pb	Pares de bases
$p_{\text{corr}}$	Valor de $p$ corrigido
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
PF	<i>Platelet factor</i> – fator plaquetário
PPBP	<i>Pro-platelet basic protein</i> – proteína básica pró-plaquetária
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i> – proteína tirosina fosfatase, não receptor tipo 22
PyK <sub>2</sub>	<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i> – tirosina quinase 2 rica em prolina
RANTES	<i>Regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i> – reguladas pela ativação expressas e secretadas pelas células T normais
RNA	Ácido ribonucleico
SC	Sistema complemento
SDF	<i>Stromal-cell derived factor</i> – fator derivado de célula do estroma

SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i> – Índice de Atividade de Doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico
Anti-Sm	Anticorpos anti- <i>Smith</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – polimorfismo de único nucleotídeo
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein particle</i> – pequena partícula de ribonucleoproteína nuclear
STAT 4	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i> – proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 4
T	Timina
TARC	<i>Thymus activation regulated chemokine</i> – quimiocina regulada por ativação do timo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	<i>T cell receptor</i> – receptor de célula T
TECK	<i>Thymus expressed chemokine</i>
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral $\beta$
Treg	Célula T regulatória
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i> – teste não treponêmico para sífilis

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	DEFINIÇÃO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES).....	15
1.2	EPIDEMIOLOGIA .....	16
1.3	FATORES DE RISCO .....	17
1.3.1	Hormonais.....	17
1.3.2	Ambientais .....	18
1.3.2.1	Infecções.....	19
1.3.2.2	Substâncias químicas .....	20
1.3.3	Genéricos.....	21
1.3.3.1	Fatores genéticos associados ao HLA .....	21
1.3.3.2	Fatores genéticos não associados ao HLA.....	23
1.4	QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES .....	26
1.4.1	CCR5 .....	29
1.4.1.1	CCR5 e LES .....	32
1.5	TERAPIA .....	33
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	OBJETIVO GERAL .....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	38
4.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	38
4.2	DELINEAMENTO DE ESTUDO .....	38
4.3	POPULAÇÕES DE ESTUDO .....	38
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	39
4.5	COLETA DAS AMOSTRAS .....	39
4.6	POLIMORFISMO GENÉTICO CCR5 $\Delta$ 32 .....	40
	FIGURA 1: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE CCR5.....	41

4.7	MARCADORES LABORATORIAIS .....	41
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
	<b>ARTIGO 1: CCR5<math>\Delta</math>32 (rs333) polymorphism is a genetic marker for susceptibility, prognosis, and clinical course of systemic lupus erythematosus in Brazilian woman patients. ....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>98</b>
ANEXO A –	Parecer do comitê de ética envolvendo seres humanos da universidade estadual de londrina .....	99
ANEXO B –	Termo de consentimento livre e esclarecido .....	102
ANEXO C –	Questionário para a coleta de dados demográficos, antropométricos, clínicos e laboratoriais .....	106

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEFINIÇÃO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)

O LES é uma doença autoimune multisistêmica e inflamatória crônica, com envolvimento de vários órgãos, grande variedade de manifestações clínicas e amplo espectro de gravidade. A doença apresenta fases de exacerbação (ou doença ativa) e remissão, e sua principal característica é a produção de autoanticorpos contra componentes celulares, formação e deposição de imunocomplexos (ICs) e lesão tecidual em vários órgãos. Com a quebra da tolerância imunológica, ocorre formação de autoanticorpos contra antígenos nucleares como ácido desoxirribonucléico (DNA) e proteínas ligadas ao DNA de dupla hélice (anti-*double-stranded* DNA ou anti-dsDNA), histonas, nucleossomas, ou contra antígenos do ácido ribonucléico (RNA), como anti-Smith (anti-Sm), anti-*small nuclear ribonucleoprotein particle* (anti-snRNP), anti-Ro (anti-SS-A), anti-La (anti-SS-B), entre outros. Os pacientes também podem produzir anticorpos contra antígenos de superfície celular como autoanticorpos contra plaquetas e eritrócitos, resultando em trombocitopenia e anemia hemolítica, respectivamente (SACK, 2004; DEVI et al., 2013; FRITZLER, 2003).

Os critérios para classificação do LES foram desenvolvidos em 1971, revistos em 1982 e em 1997 pela Associação Americana de Reumatologia; em 2012, foram revistos e validados pela *Systemic Lupus Collaborating Clinics* (SLICC) (HOCHBERG, 1997a; PETRI et al., 2012). A classificação inclui critérios clínicos, como erupção ou *rash* malar, fotossensibilidade, úlceras orais, artrite, serosites (pleurites ou pericardites), e distúrbios neurológico; critérios laboratoriais, como anormalidades hematológicas (anemia hemolítica, leucopenia ou trombocitopenia) e critérios imunológicos, como marcadores de autoanticorpos (anti-Sm, anti-dsDNA, teste não treponêmico reagente, anticorpos antinucleares, etc). Positividade para quatro dos dezoito critérios, desde que pelo menos um destes seja um critério imunológico, permite classificar o paciente como portador da doença (PETRI, 2012). Embora estes critérios tenham sido estabelecidos, a princípio, para fins de pesquisa, eles servem como marcadores para identificar as características que distinguem LES de outras doenças. Entretanto, manifestações clínicas no LES

são muito maiores do que as descritas por estes critérios, assim como a gravidade da doença pode variar amplamente desde manifestações clínicas relativamente leves com eritema cutâneo ou artrite não erosiva a sérias complicações orgânicas como nefrite lúpica e desordens neuropsiquiátricas (DORIA et al., 2006), até mesmo em pacientes com os mesmos critérios clínicos (MANZI et al., 2003).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

As taxas de incidência geral variam de 1 a 10/100.000 pessoas/ano, sendo 1/100.000 na Dinamarca e 8,7/100.000 no Brasil. A elevada exposição à luz ultravioleta (UV) durante a maioria das estações do ano é uma das razões para a alta incidência encontrada em nosso país (VILLAR, SATO, 2002). Dados de várias regiões dos Estados Unidos da América (EUA) indicam que a incidência de LES aumentou de três a sete vezes entre 1950 e 1992 (URAMOTO et al., 1999). O aumento da incidência da doença também é atribuído, pelo menos parcialmente, à disponibilidade de melhores métodos de diagnóstico, aumento da informação sobre a doença e a introdução de critérios padronizados ao longo dos últimos anos, que possibilitam a identificação de casos com manifestações clínicas mais leves (GARCÍA-CARRASCO et al., 2013).

As taxas de prevalência variam de 28,3/100.000 na Dinamarca a 149,5/100.000 pessoas na Pensilvânia, EUA (CHAKRAVARTY et al., 2007).

A sobrevida do paciente após cinco anos do diagnóstico de LES aumentou de < 50% nos anos de 1950 a 95% nos estudos mais recentes (BORCHERS et al., 2004; KASITANON; MAGDER; PETRI, 2006; UROWITZ et al., 2008; BERNATSKY et al., 2006). Após a introdução de corticosteroides e drogas imunossupressoras, o prognóstico mudou de uma doença rapidamente fatal a uma doença crônica. Apesar disto, as taxas de mortalidade para os pacientes permanecem 2-4 vezes mais elevadas quando comparadas com a população em geral (GARCÍA-CARRASCO et al., 2013).

Infecções são responsáveis por aproximadamente 25% de todas as mortes entre pacientes com LES, sendo assim uma das causas mais importantes de mortalidade da doença. O risco de infecções é maior, aparentemente, nos cinco primeiros anos de estabelecimento da doença. Geralmente tais infecções que levam à hospitalização e morte são causadas por patógenos comuns como *Streptococcus*

*pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, devido ao estado de imunossupressão do paciente em tratamento (KAMEN, 2009).

O LES afeta predominantemente mulheres, em uma proporção média de nove mulheres para cada homem (9:1). No entanto, a mesma proporção é de apenas 2:1 para a doença que se desenvolve durante a infância ou após os 65 anos de idade, mostrando claramente o papel de fatores hormonais na etiologia multifatorial da doença. Também é mais prevalente entre familiares de pacientes afetados, seguindo um padrão de herança não-Mendeliano, podendo atingir valores de até 29 vezes de chance de desenvolver a doença (ALARCÓN-SEGOVIA et al., 2005). Com características ambientais similares, quando analisada em gêmeos, a taxa de concordância da doença é de 2-5% para gêmeos dizigóticos e de 24-58% para gêmeos monozigóticos (DEAPEN et al., 1992). A taxa menor de 100% de concordância em gêmeos monozigóticos sugere que a susceptibilidade à doença seja multifatorial e envolve, também, fatores não genéticos, como ambientais e hormonais (GREGERSEN, 1993). Uma prevalência familiar de 10-12% tem sido relatada em pacientes com, pelo menos, um parente de primeiro grau com a doença (PISTINER et al., 1991). A prevalência estimada em mulheres parentes de primeiro grau é de 2,64/100 pacientes, contra 0,4/100 em controles normais (HOCHBERG, 1987), e a probabilidade de se desenvolver uma doença autoimune não-lúpica é mais alta entre parentes de primeiro grau de pacientes com LES (PRIORI et al., 2003).

### 1.3 FATORES DE RISCO

#### 1.3.1 Hormonais

Um importante fator que atrai a atenção de imunologistas e reumatologistas é o gênero. Já foi bem estabelecido o papel importante que o gênero tem na incidência de autoimunidade em doenças como LES, uma vez que ocorre mais frequentemente no gênero feminino que no masculino, tanto em camundongos como em humanos (WATSON et al., 1992). De modo geral, mulheres apresentam imunidade celular e humoral mais intensa que homens. Isto se manifesta por maiores níveis de anticorpos e de linfócitos T (LT) CD4<sup>+</sup> circulantes,

maior produção de citocinas em resposta a infecções e rápida rejeição a aloenxertos. Estas são, provavelmente, as principais razões porque a maioria dos imunologistas prefere usar modelos experimentais com fêmeas em seus estudos. Infelizmente, uma das desvantagens por tal intensidade da resposta imunológica é o aumento da susceptibilidade a doenças autoimunes (RUBTSOV et al., 2010).

Em modelos experimentais, tem sido demonstrado que a adição de estrógeno ou prolactina pode levar a um fenótipo de autoimunidade, com aumento de linfócitos B (LB) autorreativos de alta afinidade que podem concorrer com LB autorreativos de baixa afinidade. Também tem sido mostrada que a prolactina pode acelerar o desenvolvimento da doença autoimune em camundongos com pré-disposição (COHEN-SOLAL et al., 2008; CRISPÍN et al., 2010).

Enquanto a relação entre estrógeno e autoimunidade no LES tem sido razoavelmente estudada, pouco se sabe a respeito do papel da progesterona. Várias observações indicam que os hormônios sexuais femininos aumentam o risco ao LES. Incidência e predominância de mulheres com LES aumentam após a puberdade e, além disso, o risco de desenvolver a doença também está aumentado com a menarca precoce, isto é, em períodos biológicos com exposição aumentada aos hormônios sexuais femininos. Dois grandes estudos observacionais (COSTENBADER et al., 2007; BERNIER et al., 2009) indicam que o uso de estrógeno exógeno está associado com, aproximadamente, 1,5 a 3,0 vezes mais chance de desenvolver LES, enquanto outro estudo (PETRI et al., 2001) sugeriu que a contracepção apenas por progesterona é um fator protetor contra incidência da doença. Assim, progesterona e estrógeno parecem estar envolvidos na modulação do risco ao LES, por diferentes mecanismos (HUGHES, 2012).

### 1.3.2 Ambientais

A contribuição do ambiente para a manifestação do LES é inquestionável. Mudanças epigenéticas como metilação do DNA têm sido atribuídas a fatores ambientais associados ao LES. Exposição à luz UV é um fator de risco já conhecido para a doença, e várias toxinas, como as provenientes do tabagismo, têm sido incluídas em estudos epidemiológicos (CRISPÍN et al., 2010). Outras exposições ambientais, como medicamentos, agentes infecciosos, tintas para cabelo, hábitos alimentares, implantes de sílica e de silicone, têm sido associadas

ao desenvolvimento da doença, embora a força de evidência aplicada a cada fator citado varie (COSTENBADER et al., 2004).

### 1.3.2.1 Infecções

Há uma suspeita crescente de que infecções, com manifestações clínicas ou subclínicas, possam representar um gatilho primário para constante ativação do sistema imunológico e, conseqüentemente, levar à autoimunidade (GRAMMATIKOS et al., 2012).

Um agente infeccioso importante é o vírus Epstein-Barr (EBV). Muitos estudos já relacionaram o EBV com desenvolvimento de LES. Os pacientes apresentavam uma carga viral elevada anormal em células mononucleares periféricas, de 10 a 40 vezes maior, quando comparados com controles saudáveis (GROSS et al., 2005; KANG et al., 2004). A carga viral foi associada à atividade da doença, e se mostrou independente do uso de medicamentos imunossupressores. Além disso, um nível elevado de DNA de EBV foi encontrado no soro de 42% dos pacientes com LES, comparado a apenas 3% dos controles saudáveis. Os resultados de carga viral de EBV elevada sugerem que há uma replicação lítica ativa do vírus em pacientes com LES. Como a carga viral esteve associada com atividade da doença, poderia se especular que a reativação do EBV está associada também com o desenvolvimento do LES (LU et al., 2007).

Vários mecanismos têm sido associados com a indução de autoimunidade pelo EBV. A infecção pelo vírus influencia o sistema imunológico do hospedeiro diretamente e indiretamente. Diretamente pela infecção de vários linfócitos (a infecção de LB, por exemplo), que poderia resultar em proliferação dessas células, produção elevada de anticorpos e conseqüente formação de ICs; e indiretamente pela expressão de várias proteínas imunomoduladoras, como as proteínas virais envolvidas na evasão da resposta imune e supressão de apoptose nos linfócitos infectados. É provável que a ação destas proteínas resulte em perda de tolerância e desenvolvimento de autoimunidade (DRABORG et al., 2013; WUCHERPFENNIG et al., 2001).

### 1.3.2.2 Substâncias químicas

O acesso de substâncias químicas ao DNA e posterior expressão gênica é regulada por metilação do DNA e modificações nas histonas. Pacientes com LES exibem hipometilação de DNA nos LT CD4<sup>+</sup>, e este fenômeno parece ter relação com a superexpressão de vários genes. Enquanto isso ocorre espontaneamente nos pacientes, algumas drogas comumente usadas, como hidralazina e procainamida (usadas para o tratamento de pacientes com doenças cardíacas), inibem a metilação do DNA e podem induzir lúpus em indivíduos saudáveis. A desmetilação do DNA causa aumento na produção de citocinas pelos LT CD4<sup>+</sup> e hiperprodução de IgG por LB, entre outras alterações, fazendo com que as células do sistema imunológico se tornem responsivas a estímulos comuns subliminares e desencadeiem autorreatividade (BALLESTAR et al., 2006).

Além disso, o tabagismo é um dos fatores ambientais mais potentes que influenciam o desenvolvimento de doenças autoimunes. Tem sido demonstrado que pode influenciar várias doenças autoimunes e inflamatórias por diferentes mecanismos, incluindo imunomodulação (SHOENFELD et al., 2008). Uma meta-análise com estudos de 1966 a 2002 relacionando tabagismo e risco de desenvolvimento do LES encontrou que a razão de chance de um indivíduo fumante vir a ter LES é 1,5 vezes maior do que um indivíduo não fumante. Em relação às manifestações clínicas, pacientes com LES que fumavam sofriam mais de pleurite e pericardite e expressavam mais sintomas neuropsiquiátricos e cefaleia lúpica quando comparados a pacientes não fumantes (COSTENBADER et al., 2004).

Outras substâncias relacionadas à susceptibilidade ao LES são pós minerais, como pós de sílica cristalina ou quartzo. Tais pós podem ser inalados durante a jornada de trabalho em ocupações que façam uso de materiais contendo quartzo, como dentistas ou químicos, por exemplo. Finckh et al. (2006) observaram uma associação positiva entre exposição contínua (aproximadamente um ano de exposição) de trabalhadores à sílica e desenvolvimento de LES, com uma razão de chance quatro vezes maior para indivíduos expostos do que não-expostos. O exato mecanismo da ação da sílica permanece desconhecido, mas estudos *in vitro* demonstraram que este material pode atuar como um estimulador adjuvante na resposta de LT ou como indutor da apoptose (LEIGH et al, 1997; DAVIS et al., 2001).

### 1.3.3 Genéticos

Há uma forte evidência para um componente genético na susceptibilidade ao LES, baseado em uma alta taxa de concordância em gêmeos monozigóticos, bem como a ocorrência em 5-12% dos parentes dos pacientes afetados (ARNETT et al., 1984; BLOCK et al., 1975; DEAPEN et al., 1992; GILES et al., 2001). A complexa natureza do LES reflete mais a uma herança poligênica do que monogênica. Vários genes são conhecidos por conferir susceptibilidade ao LES (SESTAK et al., 2011; VYSE et al., 1998), por afetarem vias-chave, implicando em deposição de ICs, transdução de sinal envolvida na resposta imune do hospedeiro e vias de interferon (IFN), como membros da família de receptores Fcγ (*FCGR2A* e *FCGR3A*), receptores *toll-like* (*toll-like receptors – TLR*) e o fator regulador de interferon 5 (*IFN-regulatory factor 5 – IFR5*) (MOSEER et al., 2009).

Apenas em uma pequena proporção de pacientes (< 5%), um único gene parece ser responsável pelo estabelecimento da doença; entre eles, os genes que se relacionam aos componentes precoces do complemento, dos quais os genes de C2 e C4 estão ligados ao complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex - MHC*), também conhecido por antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen - HLA*) (RELLE et al., 2012).

#### 1.3.3.1 Fatores genéticos associados ao HLA

A primeira associação genética no LES foi descrita na região do HLA, no cromossomo 6p21, região que codifica mais de 200 genes, dos quais muitos têm papéis imunológicos conhecidos (GOLDBERG et al., 1976). O MHC ou HLA é uma grande região genômica localizada no cromossomo 6 humano e pode ser dividida em três regiões menores, denominadas de MHC ou HLA classe I, de classe II e de classe III (MORRIS et al., 2012). Há muito tempo, genes e antígenos do HLA têm sido associados com LES. As regiões do HLA de classes I e II contêm genes que codificam várias glicoproteínas envolvidas no processo de apresentação de antígenos para os LT CD8<sup>+</sup> e LT CD4<sup>+</sup>, respectivamente, e a região de classe III contém outros genes importantes para o sistema imunológico, como os genes *fator de necrose tumoral alfa (TNFA)*, *fator de necrose tumoral beta (TNFB)* ou *Linfotoxina alfa (LTa)*, *C2*, *C4A* e *C4B* (DENG; TSAO, 2010).

Dos genes HLA de classe II, observou-se que os alelos *HLA-DR2* (*DRB1\*1501*) e *HLA-DR3* (*DRB1\*0301*) estão associados com LES em muitas populações Europeias, com duas vezes mais chance de desenvolver a doença, para cada alelo (TSAO et al., 2002). O haplótipo HLA estendido, como por exemplo, *HLA-A1, B8, C4AQ0, C4B1, DR3* e *DQ2*, incluindo dois alelos dos genes de classe III, *C4AQ0* e o alelo variante do *TNFA* (TNF-308A) encontrado na população europeia é comumente implicado na susceptibilidade ao LES. Além desse, outros três haplótipos individuais identificados, também associados à susceptibilidade à doença, foram *HLA-DRB1\*1501 (DR2)-DQB1\*0602*, *DRB1\*0801 (DR8)-DQB1\*0402* e *DRB1\*0301 (DR3)-DQB1\*0201* (GRAHAM et al., 2002). Em adição aos estudos em populações Europeias, a associação entre susceptibilidade ao LES e os alelos *HLA-DR2* e *HLA-DR3* foi confirmada também em indivíduos asiáticos (DOHERTY et al., 1992; HONG et al., 1994; LEE et al., 2003)

Em relação aos genes do HLA de classe III, alguns têm maior destaque. Deficiências completas dos genes *C2* ou *C4*, por exemplo, são raras e estão associadas com alto risco de desenvolvimento do LES. Mais de 75% de pacientes com deficiência de *C4* e cerca de 20% daqueles com deficiência de *C2* desenvolvem uma doença semelhante ao LES ou *lupus-like* (WU et al., 2009; TRUEDSSON et al. 2007). Deficiência completa de *C4A* está associada com susceptibilidade ao LES em muitos grupos étnicos, incluído populações Europeias e do Leste-asiático. O gene *C4A* é expresso em variações do número de cópias (*copy number variations* – CNV) e observou-se que possuir três ou mais cópias confere proteção à doença, pois há produção suficiente de proteínas *C4* para alcançar os níveis basais na circulação para a realização da depuração de IC. Entretanto, menos de três CNV do gene *C4A* conferem susceptibilidade ao LES (YANG et al., 2007).

Outra associação gênica importante ao LES é um polimorfismo de único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* – SNP) na região promotora do gene *fator de necrose tumoral alfa (TNFA)*. Neste há uma troca de Guanina (G) por Adenina (A) na posição -308, que resulta em uma produção elevada do fator de necrose tumoral alfa (TNFA) e tem sido associada ao desenvolvimento da doença em alguns estudos (SUÁREZ, 2005; ROOD, 2000). Entretanto, este SNP foi excluído como fator de risco independente em estudos realizados em indivíduos do Reino Unido e EUA (YANG et al., 2007, FERNANDO et al., 2007).

### 1.3.3.2 Fatores genéticos não associados ao HLA

Com o avanço da tecnologia e a colaboração entre pesquisadores, estudos genéticos em várias populações diferentes permitiram identificar muitos genes importantes no desenvolvimento da doença. Os primeiros, como já citados, estavam relacionados ao HLA. Entretanto, muitos outros genes que estão relacionados a vários mecanismos da resposta imunológica, não relacionados necessariamente ao HLA, foram também identificados.

O *IFR5* regula a expressão de genes dependentes de citocinas inflamatórias e genes envolvidos na apoptose. *IRF5* é um dos *loci* não HLA mais fortemente e consistentemente associado ao desenvolvimento de LES. Estudos de associação em variados grupos étnicos identificaram quatro variantes funcionais e os haplótipos definidos por diferentes combinações dessas variantes estão associados com níveis de risco elevados, diminuídos e indiferentes para a doença (GRAHAM et al., 2006; GRAHAM et al., 2007; SIGURDSSON et al., 2008a; DEMIRCI et al., 2007; SHIN et al., 2007; KAWASAKI et al., 2008b; SIU et al., 2008; KELLY et al., 2008; LÖFGREN et al., 2010). Tal é a importância do *IRF5*, que ele é necessário para o desenvolvimento de doenças *lupus-like* em camundongos, e estudos ainda sugerem que este gene tenha um possível papel na patogênese do LES por outras vias além da produção de IFN tipo-I (RICHEZ et al., 2010).

O gene que codifica a proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição 4 (*STAT4*) tem sido associado ao LES em várias populações Europeias e Asiáticas (HOM et al., 2008; HARLEY et al., 2008; KOZYREV et al., 2008). Alguns estudos evidenciaram o alelo T de menor frequência do SNP rs7574865, localizado no terceiro íntron do *STAT4* como fortemente associado a um fenótipo mais grave de LES. Este fenótipo grave foi caracterizado por idade precoce de início da doença (< 30 anos), alta frequência de nefrite, presença de anticorpos anti-dsDNA e sensibilidade elevada para sinalização de IFNA em células mononucleadas periféricas, com uma razão de chance de 1,5 – 1,7 (HARLEY et al., 2008; GRAHAM et al., 2008; GATEVA et al., 2009; HAN et al., 2009a; YANG et al., 2010; REMMERS et al., 2007; TAYLOR et al., 2008; PALOMINO-MORALES et al., 2008; KAWASAKI et al., 2008a). Observou-se também que indivíduos portadores de um ou mais alelos polimórficos de risco de ambos *STAT4* e *IRF5* apresentam risco aumentado para

desenvolvimento de LES, sugerindo uma interação genética entre estes dois genes (SIGURDSSON et al., 2008b).

O gene *PTPN22* codifica a proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22* – PTPN22), uma fosfatase linfóide específica, que inibe ativação de LT (COHEN et al., 1999). Um SNP não sinônimo, com a troca do aminoácido Arginina por Triptofano na posição 620 (Arg620Trp) está associado com risco de desenvolvimento de múltiplas doenças autoimunes, incluindo LES (GREGERSEN et al., 2009), fornecendo evidência da existência de mecanismos compartilhados por estas doenças, apesar das diferenças nas manifestações clínicas. Esta substituição Arg620Trp aumenta a atividade da fosfatase intrínseca linfóide-específica da PTPN22, a qual reduz o limiar para sinalização de receptor de células T (*T cell receptor* – TCR), promovendo autoimunidade (BOTTINI et al., 2004). Em contrapartida, uma variante com a substituição de Arginina por Glutamina na posição 263 (Arg263Gln) no domínio catalítico da PTPN22, que reduz a atividade fosfatase da PTPN22 e, conseqüentemente, aumenta o limiar da sinalização para TCR, foi associada com proteção para LES em pacientes Caucasianos (ORRÚ et al., 2009).

Receptores da porção Fcγ de anticorpos (FcγR), codificados por alguns genes como *FCGR2A* e *FCGR3A*, reconhecem ICs e estão envolvidos em respostas dependentes de anticorpos. Múltiplas variantes funcionais desses genes têm sido identificadas como fatores de risco para LES. Um SNP não sinônimo com a substituição de Histidina por Arginina na posição 131 (His131Arg) do *FCGR2A* está associado com uma baixa afinidade para partículas opsonizadas por IgG2, e conseqüente depuração reduzida de ICs (BREDIUS et al., 1993). Apesar de estudos com este SNP terem mostrado dados inconsistentes sobre associação com LES em algumas populações, como Europeus, Afroamericanos e Coreanos (DUITS et al., 1995; YAP et al., 1999; CHEN et al., 2004; SALMON et al., 1996; SONG et al., 1998), foi confirmada sua associação com susceptibilidade à doença em mulheres Caucasianas (HARLEY et al., 2008).

Outro SNP não sinônimo (rs396991) no gene *FCGR3A* altera as afinidades de ligação no receptor codificado para ICs contendo IgG1, IgG3 ou IgG4. A baixa afinidade resultante do alelo variante, que confere depuração menos eficiente de ICs, esteve associada com LES mais do que outros alelos (KOENE et al., 1998a), porém, em pacientes com envolvimento renal, o alelo de alta afinidade

esteve associado com progressão ao estágio final da doença (ALARCÓN et al., 2006).

Uma vez que IgG2 e IgG3 são as subclasses mais importantes presentes em ICs depositados em amostras de biópsia renal de pacientes com nefrite lúpica (ZUNIGA et al., 2003), a relativa importância do *FCGR2A-H/R131* e *FCGR3A-V/F158* à progressão da doença pode depender da subclasse de IgG dos anticorpos patogênicos em um paciente em particular. Como estes três genes são frequentemente herdados em conjunto (MAGNUSSON et al., 2004), a presença de múltiplos alelos de risco poderia aumentar ainda mais a chance de desenvolvimento do LES (SULLIVAN et al., 2003). Há ainda muitos outros SNPs em outros genes codificadores de FcγR, como *FCGR2B* e *FCGR3B*, que já foram estudados e também têm sua contribuição na susceptibilidade ao LES (SALMON et al., 1990; KOENE et al., 1998b; KYOGOKU et al., 2002).

O sistema complemento (SC) facilita a depuração de fragmentos celulares e restos apoptóticos que poderiam conter antígenos nucleares pela opsonização destas partículas-alvo para autoanticorpos no LES. O componente do Complemento 1q (C1q; codificado por *C1QA*, *C1QB* e *C1QC*) é parte da via clássica de ativação do SC e, juntamente com os componentes enzimaticamente ativos C1r e C1s, formam o complexo C1. Deficiência completa de C1q, embora rara, é um fator de risco poderoso para LES e mais de 90% dos indivíduos com esta deficiência desenvolvem manifestações lúpicas ou *lupus-like* (WALPORT et al., 1998). Imaginava-se que o mecanismo patogênico envolvido seria somente a depuração defeituosa de ICs; entretanto, estudos demonstraram que C1q possui efeito regulatório na produção de citocinas induzidas por TLR (YAMADA et al., 2004), assim como na produção de IFNA induzida por ICs (LOOD et al., 2009), fornecendo explicações adicionais sobre o elevado risco associado a LES em pessoas com deficiência de C1q.

Também relacionado com a função do SC na depuração de ICs no LES, *ITGAM* é um gene que codifica uma integrina alfa-M (também conhecida como receptor de complemento 3). Esta integrina é uma molécula de adesão que liga o fragmento clivado C3b, e também muitos outros ligantes potencialmente relevantes no LES (LUO et al., 2007). Uma variante não sinônima com a substituição de Arginina por Histidina na posição 77 (Arg77His), que resulta em mudanças estruturais e funcionais da integrina, mostrou estar associada ao LES (NATH et al.,

2008). Em uma subsequente meta-análise, este SNP mostrou uma frequência de 9-11% em indivíduos Americanos descendentes de populações Europeias, Africanas e Hispânicas, e demonstrou uma forte associação com LES (HAN et al., 2009b).

O gene *IL10* codifica a interleucina 10 (IL-10), uma importante citocina com propriedades imunossupressoras e imunoestimulatórias. Sabe-se que a produção aumentada de IL-10 por LB e monócitos, no sangue periférico de pacientes com LES, está correlacionada com atividade da doença. Um estudo levou à identificação de haplótipos (definidos por três SNPs na região promotora), que estão associados com maiores níveis secretados de IL-10 (ESKDALE et al., 1998) e associações entre estes SNPs e susceptibilidade ao LES foram registradas em populações Europeias, Hispânicas, Americanas e Asiáticas (ESKDALE et al., 1997; MEHRIAN et al., 1998; CHONG et al., 2004).

Genes que codificam quimiocinas e seus receptores também têm sido implicados na patogênese e evolução clínica do LES e são discutidos no item 1.4. Após os genes *HLA*, os que codificam as quimiocinas são provavelmente os mais polimórficos conjuntos de genes no sistema imunológico e está se tornando fortemente evidente que os polimorfismos nestes genes influenciam a resposta imunológica e, conseqüentemente, a susceptibilidade a uma variedade de doenças.

#### 1.4 QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES

O recrutamento correto de células para sítios inflamatórios é dependente de uma sinalização imunológica eficiente. Quimiocinas são uma superfamília de proteínas que exercem um papel importante na inflamação. Possuem baixo peso molecular e a maioria apresenta 90 a 130 resíduos de aminoácidos. Seletivamente e muitas vezes especificamente, controlam a adesão, a quimiotaxia e a ativação de muitos tipos de populações e subpopulações de leucócitos. Conseqüentemente, elas são as principais reguladoras do tráfego leucocitário, atraindo células inflamatórias como leucócitos e macrófagos por interagirem com os receptores expressos nas superfícies dessas células (MARTENS et al., 2010).

Algumas quimiocinas podem ser produzidas em resposta a um estímulo inflamatório e atuam recrutando leucócitos para locais de inflamação; outras são geradas constitutivamente em vários tecidos e recrutam leucócitos

(maioria linfócitos) para esses tecidos na ausência de inflamação. Com isto, é possível dividir as quimiocinas em diferentes perfis, homeostáticas e inflamatórias; um cuja expressão sugere mais uma função homeostática; outro, com uma função mais aparente na regulação da inflamação (GUERREIRO et al., 2011).

Contudo, várias quimiocinas não podem ser classificadas exclusivamente como homeostáticas ou inflamatórias, sendo referidas como quimiocinas de “dupla função”. Quimiocinas de dupla função participam nas funções de defesa imunológica e estão exacerbadas em condições inflamatórias, e também atuam em leucócitos não efetores, incluindo leucócitos inativos e imaturos, em locais de desenvolvimento de leucócitos e vigilância imunológica. Muitas destas quimiocinas são altamente seletivas para linfócitos e agem tanto no desenvolvimento de LT no timo quanto no recrutamento de células em sítios inflamatórios. Notavelmente, e em contraste com quimiocinas homeostáticas e de dupla função, quimiocinas inflamatórias possuem ampla seletividade de receptores (MOSER et al., 2004).

As quimiocinas possuem quatro resíduos de cisteína conservados e são classificadas em quatro subgrupos distintos de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos invariáveis de cisteína localizados na porção N-terminal da molécula. O subgrupo C-C ou beta quimiocinas é constituído pelas quimiocinas que apresentam as cisteínas uma ao lado da outra. São denominadas de CCL1 (I-309), CCL2 (*macrophage chemotactic protein 1*, MCP-1), CCL3 (*macrophage inflammatory protein 1 alpha*, MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (*macrophage inflammatory protein 1 beta*, MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL11 (*Eotaxin*), CCL13 (MCP-4), CCL14 (*hemofiltrate C-C chemokines 1*, HCC-1), CCL15 (HCC-2), CCL16 (HCC-4), CCL17 (*thymus activation regulated chemokine*, TARC), CCL18 (*pulmonar activation regulated chemokine*, PARC), CCL19 (MIP-3 $\beta$ ), CCL20 (*liver activation regulated chemokine*, LARC), CCL21 (*secondary lymphoid-tissue chemokine*, SLC), CCL22 (*macrophage derived chemokine*, MDC), CCL23 (MIP-3), CCL25 (*thymus expressed chemokine*, TECK), CCL26 (MIP-4 $\alpha$ ), CCL27 (*cutaneous T-cell attracting chemokine* - CTACK) e CCL28 (*mucosae-associated epithelial chemokine*, MEC) (MORÁN et al., 2013).

O subgrupo CXC ou alfa quimiocinas é constituído pelas quimiocinas que apresentam as cisteínas separadas por algum outro aminoácido. São

denominadas de CXCL1 (*growth regulated oncogene alpha*, GRO- $\alpha$ ), CXCL2 (GRO- $\beta$ ), CXCL3 (GRO- $\gamma$ ), CXCL4 (*platelet factor 4*, PF4), CXCL5 (*epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78*, ENA 78), CXCL6 (*granulocyte chemotactic protein 2*, GCP-2), CXCL7 (*pro-platelet basic protein*, PPBP), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (*monokine induced by gamma interferon*, MIG), CXCL10 (*interferon gamma induced-protein 10*, IP-10), CXCL11 (*interferon-inducible T cell alpha chemoattractant*, I-TAC), CXCL12 (*stromal cell-derived factor 1*, SDF-1), CXCL13 (*B lymphocyte chemoattractant*, BLC), CXCL14 (*breast and kidney-expressed protein*, BRAK), CXCL16 e CXCL17 (*dendritic cell and monocyte-attracting chemokine-like protein*, DMC) (MORÁN et al., 2013).

O subgrupo de CX3C é constituído pelas quimiocinas que apresentam as cisteínas separadas por três outros aminoácidos. São denominadas de CX3CL1 (*fractalcina/neurotactina*). E o subgrupo XC de quimiocinas, em que há somente uma molécula de cisteína, é denominado XCL (*linfotactina*) (MORÁN et al., 2013).

A ação das quimiocinas é mediada por receptores cuja cadeia polipeptídica apresenta sete domínios  $\alpha$ -helicoidais transmembranais e quando se ligam à quimiocina apropriada, estes receptores ativam grandes proteínas ligadas à proteína G. Esta ativação dá início ao processo de transdução de sinal que gera potentes segundos mensageiros como AMPc, IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup> e as proteínas G pequenas ativadas. Assim como ocorre com as citocinas, a interação entre as quimiocinas e seus receptores tem alta afinidade e alta especificidade. Entretanto, na maioria dos receptores se ligam mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas conseguem se ligar a mais de um receptor (MORÁN et al., 2013).

Os receptores de C-C quimiocinas são denominados de CCR1 a CCR10. Os receptores de CXC quimiocinas são denominados de CXCR1 a CXCR6 e o receptor de CX3C é denominado de CX3CR. Padrões diferentes de expressão dos receptores são observados nas diferentes populações e subpopulações de leucócitos humanos. Os neutrófilos expressam CXCR1, CXCR2 e CXCR4; os eosinófilos possuem o CCR1 e o CCR3; enquanto que as células T virgens apresentam poucos tipos de receptores de quimiocinas, algumas células T ativadas possuem os receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3, CXCR4 e, possivelmente, outros. As subpopulações de LT também exibem diferentes expressões de receptores de quimiocinas. Os LT *helper 2* (Th2) expressam o CCR3,

CCR4 e vários outros receptores que não são expressos pelos LT *helper* 1 (Th1). Por outro lado, os LTh1 expressam o CCR5 e o CXCR3, que a maioria das células Th2 não expressa. As diferenças na expressão dos receptores de quimiocinas pelos leucócitos associadas à produção diferenciada de quimiocinas pelos tecidos e sítios de destino, fornecem grandes oportunidades para a regulação diferencial das atividades das diferentes populações de leucócitos (MORÁN et al., 2013).

Pacientes com LES apresentam aumento da expressão de receptores de quimiocinas, tais como CXCR2, CXCR3, CCR3 e CCR1, e níveis circulantes elevados das quimiocinas CCL2, CCL3, CXCL12, CXCL10 e CCL5 (ERIKSSON et al., 2003). Estudos têm sugerido que quimiocinas estão associadas com o envolvimento renal e atividade do LES (YE et al., 2005; LIT et al., 2005; CHAN et al., 2004). Vilá et al (2007) verificaram que pacientes com LES apresentaram níveis mais elevados de CCL4 e CCL5 que indivíduos saudáveis e que CCL3 foi associado com lúpus discoide e CCL4 com dano acumulado no LES, sugerindo que as quimiocinas podem exercer um papel na patogênese do LES.

#### 1.4.1 CCR5

O CCR5 é um receptor de quimiocinas que pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Aproximadamente 20-30% dos LT periféricos e 10% dos monócitos são positivos para CCR5 (MACK et al., 1999). O CCR5 é expresso em LTh1, LT de memória, neutrófilos, monócitos, macrófagos, células *natural killers*, células dendríticas derivadas do sangue periférico, células endoteliais, células epiteliais, células do músculo liso vascular e fibroblastos. A expressão do CCR5 também foi relatada em células progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>, células de Langerhans, neurônios, astrócitos e timócitos (IMAI et al., 1999; MURPHY et al., 2000; MACK et al., 2001). Sua expressão é aumentada por citocinas pró-inflamatórias (LEHNER, 2002; AHMADABADI et al., 2013), assim como pelo fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) (SONG et al., 2012).

O CCR5 pode inibir a produção de cAMP, enquanto que estimula a liberação de Ca<sup>2+</sup> e promove a ativação da PI3-quinase, proteína quinase ativada por mitógeno (MAP) e outras cascatas de tirosina quinases incluindo a quinase de adesão focal (FAK) e tirosina quinase 2 rica em prolina (Pyk2), que exercem importante papel no movimento e migração celular (BLANPAIN et al., 2003). CCR5

exerce um papel chave na resposta imune variando de infiltração à ativação das células imunes.

As principais quimiocinas que se ligam a este receptor são CCL5, CCL3, CCL4, CCL8, e CCL14 (LINDNER et al., 2007; MORÁN et al., 2013). O CCR5 é também o principal co-receptor para a entrada da cepa com tropismo para o macrófago (M-trópica) do vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus* – HIV) na célula do hospedeiro. A ligação sequencial da subunidade gp120 da glicoproteína de superfície do envelope do HIV com os receptores CD4 e CCR5 expressos na membrana celular induz uma conformação “fusogênica” no envelope viral, que penetra na membrana celular e resulta em uma fusão entre as membranas viral e celular. O CCR5 é um alvo atrativo para tratamento e prevenção da infecção pelo HIV e a primeira droga bloqueadora de CCR5, o maraviroc, foi aprovada em 2007 pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) (DE VOUX et al., 2013).

Estudos demonstraram que o CCR5 é expresso em altos níveis nas células Th1 e é virtualmente ausente nas células Th2. Na avaliação da função dos receptores pela mensuração da quimiotaxia na resposta às quimiocinas selecionadas, os LTh1 responderam às quimiocinas CCL4 e CXCL10, mas não à CCL11, enquanto que os LTh2 responderam às CCL11 e CXCL10, mas não à CCL4, como esperado, de acordo com a expressão diferenciada dos receptores de quimiocinas nestas células. Estes estudos confirmaram que o CCR5 é uma característica do fenótipo Th1 sendo expresso em altos níveis em 100% dos clones de LTh1 enquanto que somente 10% dos clones de LTh2 expressam CCR5 (LOETSCHER et al., 1998; SALLUSTO; LANZAQVECCHIA; MACKAY, 1998).

O gene *CCR5* está localizado na posição 21 do braço curto do cromossomo 3 humano (3p21), que é um *locus* para outros genes de receptores de quimiocinas (AL-ADBULHADI. AL-RABIA, 2010). Foi descrita uma deleção de 32 pares de bases (pb) no exon 3 do *CCR5*, denominada de *CCR5Δ32* (rs333), que leva a uma mudança de quadro, criando um códon de parada prematuro e resultando na produção de um receptor disfuncional. Esta deleção leva a uma menor expressão deste receptor, pois a proteína alterada falha em alcançar a superfície da célula e, conseqüentemente, em indivíduos homocigotos para este polimorfismo, há completa ausência da expressão do CCR5 nas células. Este polimorfismo está presente em várias populações Européias, com uma frequência de 5 a 16%,

enquanto é praticamente ausente em alguns grupos étnicos, como Africanos, Japoneses e Chineses, apresentando um gradiente norte-sul na população Caucasiana da Europa (SAMSON et al., 1996; MAGIEROWSKA et al., 1998; WANG et al., 2003; VARGAS et al., 2009).

Estudos realizados na população brasileira demonstraram que o alelo variante *CCR5Δ32* está presente na frequência de 0,032 em indivíduos do Estado de São Paulo (MIKAWA; TAGLIAVINI; COSTA, 2002) e de 0,0517 em indivíduos de Londrina e região do Estado do Paraná (KAIMEN-MACIEL et al., 2007). Posteriormente, uma frequência geral de 0,0418 do alelo variante *CCR5Δ32* foi observada na população de Londrina e região, sendo 0,0504 em Caucasianos, 0,0280 em Pardos e ausente em Negros e descendentes de Asiáticos (REICHE et al. 2008).

O CCR5 tem um papel importante na regulação da migração e ativação de células do sistema imune durante a resposta imunológica contra micro-organismos e autoantígenos e desordens de hipersensibilidade. Portanto, qualquer alteração na sequência do gene que codifica o CCR5 ou na sua expressão pode ser associada com doenças relacionadas ao sistema imune (GHORBAN et al., 2013).

A ausência do CCR5 potencialmente interfere em várias situações, tais como doenças inflamatórias e desenvolvimento de câncer (VARGAS et al., 2009). Estudos prévios revelaram associação entre o alelo *CCR5Δ32* com esclerose múltipla (SELLBEJERG et al., 2000; KAIMEN-MACIEL et al., 2007), diabetes *mellitus* tipo 2 (MUNTINGHE et al., 2009), asma (BISSET; SCHMID-GRENDELNEIER, 2005), anemia falciforme (CHIES; NARDI, 2001; VARGAS et al., 2005), doença de Chron (HERFARTH et al., 2001), artrite juvenil idiopática (SCHEIBEL et al., 2008) e artrite reumatoide (KOHEN et al, 2007).

O alelo *CCR5Δ32* em Caucasianos da Eslovênia pode estar envolvido na proteção contra o desenvolvimento de síndrome de Sjögren primária (PETREK et al., 2000). Homozigose para o alelo *CCR5Δ32* se mostrou protetor contra artrite reumatoide (POKORNY et al., 2005; MARTENS et al., 2009) e o bloqueio do CCR5 poderia ser um novo alvo terapêutico para esta doença.

#### 1.4.1.1 CCR5 e LES

Muitos estudos têm buscado o entendimento da relação entre o alelo variante *CCR5Δ32* e LES. O papel protetor do alelo *CCR5Δ32* foi verificado em dois estudos recentes. Schauren et al. (2013) analisaram as frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo em pacientes brasileiros com LES e observaram que o alelo *CCR5Δ32* parece conferir um fator de proteção contra o desenvolvimento da doença em pacientes descendentes de Europeus Caucasianos. Entretanto, uma análise multivariada incluindo todas as mulheres, controladas pela presença ou ausência de anticorpos anti-dsDNA, etnia e idade no diagnóstico de LES, mostrou um aumento de 3,9 vezes a chance de desenvolver nefrite lúpica (NL) de classe IV nas mulheres portadoras do alelo *CCR5Δ32*. Carvalho et al (2013) encontraram uma menor frequência do genótipo em heterozigose para o alelo *CCR5Δ32* em um grupo de pacientes Portugueses com LES (8%) em comparação a controles saudáveis (15%) sugerindo um papel protetor do *CCR5Δ32*. Estes resultados sinalizam para o papel protetor dos LTh1 que expressam CCR5 na patogênese do LES.

Outros estudos verificaram que o alelo *CCR5Δ32* não estava associado com proteção ao LES; no entanto, apresentou associação com a produção de autoanticorpos específicos do LES. Apesar de não ter sido encontrada associação entre este polimorfismo e susceptibilidade ao LES em pacientes Espanhóis, foi observada uma relação entre o alelo *CCR5Δ32* e produção aumentada de anticorpos anti-dsDNA em pacientes com NL (AGUILAR et al., 2003). Mamtani et al. (2008) relataram uma associação positiva entre *CCR5Δ32* e chance de desenvolvimento da doença, mostrando associação com elevada concentração de autoanticorpos e NL em pacientes dos EUA e Colômbia. Outro estudo realizado em pacientes Asiáticos procurou importantes diferenças na expressão de receptores em células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> provenientes do sangue periférico e tecido renal. Os resultados não demonstraram variações significativas da presença do CCR5, mas foi observada uma diminuição número de células T CD4<sup>+</sup> CCR4<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes, e um número elevado destas células CCR4<sup>+</sup> infiltradas em biópsia renal em pacientes com NL. Uma vez que o CCR4 é preferencialmente expresso em células Th2, tais células poderiam ser seletivamente recrutadas da circulação para o tecido renal em pacientes com NL, levando a um pior prognóstico da doença

(YAMADA et al., 2002). Martens et al (2009) também não observaram associação entre o *CCR5Δ32* e a susceptibilidade ao LES ou NL.

## 1.5 TERAPIA

Embora o padrão e gravidade do envolvimento orgânico determinem a terapia com drogas específicas, um número de conceitos gerais é aplicado a cada paciente. O LES é uma doença que varia entre atividade e remissão clínica e os medicamentos têm como objetivos principais diminuir a resposta autoimune e seus efeitos lesivos nos diferentes órgãos e tecidos; minimizar os riscos de reativação da doença durante período de relativa estabilidade e controlar sintomas de menores riscos, mais frequentemente problemáticos do dia a dia (MANSON et al., 2006). Evitar a exposição direta ou refletida de raios solares e outras fontes de luz UV, luz fluorescente ou halogênica. O uso de protetor solar, preferencialmente os que bloqueiam UV-A e UV-B, com alto fator protetor solar ( $\geq 55$ ) são recomendados (GARCÍA-CARRASCO et al., 2013).

Nos últimos 30 anos, a terapia medicamentosa usada tem sido baseada no uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES), corticosteroides, antimaláricas e imunossupressoras. Hidroxicloroquina é o antimalárico usado como primeira linha de tratamento em conjunto com AINES. É eficaz para o tratamento e prevenção de manifestações brandas da doença; entretanto, não é eficiente na prevenção das manifestações graves da doença. Possuem papel principal no tratamento do LES, especialmente como agentes poupadores de corticosteroides, os antimaláricos, que inibem a função do fagossoma, inibindo, assim, a ativação de receptor de linfócito T (TCR – *T cell receptor*) com uma consequente menor expressão de interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e, diminuindo assim, o processamento de antígenos necessário para a apresentação de autoantígenos (DOIRA et al., 2008; WALLACE, 2001).

Corticosteroides, como glicocorticoides, são os principais anti-inflamatórios usados no controle do LES. Glicocorticoides são bastante usados, especialmente no início de reativação da doença, por seus grandes efeitos em ambas as respostas da imunidade inata e adaptativa. Inibem respostas de células T e B e funções efetoras de monócitos e neutrófilos, por meio da inibição da atividade de NF- $\kappa$ B (AUPHAN et al., 1995).

Entre os imunossupressores, incluem-se a ciclofosfamida, ciclosporina, tacrolimus, leflunomide, metotrexato, azatioprina e mofetil micofenolato (GARCÍA-CARRASCO et al., 2013). A ciclofosfamida é um agente alquilante, imunossupressor, usado no tratamento de pacientes com sintomas mais graves devido ao seu alto risco de toxicidade, o que inclui infertilidade, infecção e risco de câncer em longo prazo. É usada como pulsoterapia endovenosa, em associação com corticosteroides no tratamento de pacientes com NL, e também usada para tratar pacientes com algumas síndromes neuropsiquiátricas no LES (como psicose aguda e estado confusional) (LEVY et al., 2012).

Azatioprina é um análogo de purina e tem um papel importante no tratamento do LES, especialmente como um agente poupador de corticosteroides. Azatioprina é inativa até ser metabolizada a mercaptopurina, quando então desempenha sua ação imunossupressora inibindo a síntese de DNA e prevenindo proliferação celular no sistema imune. Apesar de ter eficácia superior à dos corticosteroides no tratamento da NL proliferativa difusa, é menos eficaz que a ciclofosfamida (YILDIRIM-TORUNER e DIAMOND, 2011).

Apesar de estes medicamentos serem usados há muito tempo, alternativas terapêuticas estão sob constantes estudos, as quais têm como alvo células ou moléculas específicas relacionadas à disfunção do sistema imune. Por exemplo, a depleção de células B pelo uso do rituximabe, um anticorpo monoclonal anti-CD20, anteriormente usado no tratamento de linfomas de células B, tem sido aplicada aos pacientes com doença grave e que não mais respondem ao tratamento convencional (LEANDRO et al., 2002). Outro medicamento é o belimumabe, um anticorpo monoclonal humano que inibe a atividade biológica das formas solúveis do fator ativador de LB, denominado BLys (*B lymphocyte stimulator*). Anti-BLys é uma nova terapia para pacientes com LES ativo (GARCÍA-CARRASCO et al., 2013). O transplante de células tronco hematopoiéticas proporciona ao receptor um período livre da influência das células T de memória durante o qual ocorre a maturação das novas células progenitoras do sistema linfóide. Os transplantes autólogo e alogênico de células tronco hematopoiéticas ainda permanecem complexos e de custo elevado, apesar da melhora dos índices de mortalidade relacionados ao tratamento convencional (GARCÍA-CARRASCO et al., 2013).

Diante das limitações de cada terapia atualmente disponível para o tratamento de pacientes com LES, o estudo genético de moléculas envolvidas na

patogênese e atividade da doença é um grande desafio na medida em que pode fornecer novos alvos terapêuticos que levem em consideração o perfil genético de cada paciente.

## 2 JUSTIFICATIVA

A epidemiologia do alelo *CCR5Δ32* é diferente entre populações etnicamente distintas e resultados controversos são relatados sobre o papel do *CCR5* e do polimorfismo genético *CCR5Δ32* na susceptibilidade e manifestações clínicas do LES. Este alelo variante pode ser frequente e, portanto, mais importante em algumas populações e menos em outras, segundo suas características genéticas e as diferenças na exposição a fatores ambientais associados ao LES. Foram realizados estudos sobre o alelo *CCR5Δ32* em pacientes com LES de diferentes populações do Hemisfério Norte, como os Europeus e os Asiáticos e os resultados obtidos são, por muitas vezes, contraditórios e de limitado poder de generalização para populações geneticamente mais heterogêneas como a brasileira. Além disso, o fato de o LES ser uma doença de alta incidência no Brasil, devido à exposição a vários fatores de risco de desenvolvimento da doença, tais como a elevada exposição à luz UV, aumenta ainda mais o interesse na investigação da fisiopatologia desta doença.

Deste modo, este estudo tem como justificativa a investigação deste polimorfismo genético em pacientes com LES da região sul do Brasil, na tentativa de melhor compreender o papel do *CCR5* na susceptibilidade, manifestações clínicas e alterações laboratoriais do LES, e com isto, contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento de pacientes com LES que levem em consideração este marcador genético.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o polimorfismo genético *CCR5Δ32* em pacientes com LES e em controles livres de doença, na região de Londrina, Paraná.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Inserir um maior número de pacientes com LES e controles saudáveis ao banco de amostras de material biológico atualmente disponível nos Setores de Imunologia Clínica e Diagnóstico Molecular do Laboratório de Análises Clínicas do HU de Londrina;

3.2.2 Descrever as características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes com LES atendidos em Londrina, Paraná;

3.2.3 Determinar a frequência genotípica e alélica do polimorfismo genético *CCR5Δ32* em pacientes com LES e em indivíduos saudáveis;

3.2.4 Avaliar a associação entre o polimorfismo genético *CCR5Δ32* e as características clínicas e laboratoriais das pacientes com LES;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE: 0186512.0.0000.5231, Parecer n. 210.328) em 04 de março de 2013 (ANEXO 1). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa (ANEXO 2).

### 4.2 DELINEAMENTO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional caso-controle para os objetivos 3.2.2 e 3.2.3 e, em sequência, um estudo transversal entre os pacientes com LES para o objetivo 3.2.4.

### 4.3 POPULAÇÕES DE ESTUDO

A população de casos foi constituída por 120 pacientes com LES do sexo feminino com diagnóstico de LES, atendidas no Ambulatório de Reumatologia do Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), obtida por conveniência de tempo e local, de forma consecutiva. As pacientes tiveram o diagnóstico de LES segundo os critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia (HOCHBERG, 1997). A atividade da doença foi avaliada por meio do instrumento SLEDAI (BOMBARDIER et al., 1992) e as pacientes foram categorizadas como LES inativo (SLEDAI  $\leq$  3) e LES ativo (SLEDAI  $>$  3) (AMOURA et al., 2003). Os dados relativos ao diagnóstico foram coletados retrospectivamente de prontuários médicos. Os dados demográficos, antropométricos, clínicos e terapêuticos foram coletados pelo grupo de pesquisa por meio de um questionário padronizado (ANEXO 3) e por consulta aos prontuários do Hospital Universitário da Universidade Estadual Londrina. Os dados laboratoriais foram coletados pela

consulta ao banco de dados do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, disponíveis no programa LABHOS.

A população controle foi constituída por 132 doadores de sangue fidelizados, do sexo feminino, do Hemocentro Regional de Londrina, em Londrina, Paraná. Os dados demográficos e clínicos foram coletados por meio de um questionário padronizado (ANEXO 3).

#### 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo, para o grupo caso, pacientes do sexo feminino, idade entre 18 a 60 anos. A atividade da doença foi determinada pelos critérios estabelecidos como SLEDAI score  $> 3$ , e/ou complemento sérico C3  $< 90\text{mg/dL}$ , e/ou complemento sérico C4  $< 10\text{ mg/dL}$ , e/ou anti-dsDNA  $\geq 1:10$  (BOMBARDIER et al., 1992).

Foram selecionados para o grupo controle, doadores de sangue do sexo feminino, idade entre 18 a 60 anos, com resultado sorológico não reagente para todos os testes sorológicos realizados na triagem de doadores de sangue, como anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (anti-HIV), contra o vírus da hepatite C (anti-HCV), antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), contra o antígeno core do vírus da hepatite B (anti-HBc), contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II (anti-HTLV I/II), anti-*Trypanosoma cruzi* e teste não treponêmico para sífilis (VDRL).

Foram excluídos homens, mulheres com menos de 18 anos ou mais de 60 anos, e indivíduos que apresentaram doença infecciosa ou autoimune, determinada clínica e/ou laboratorialmente.

#### 4.5 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de sangue periférico dos indivíduos envolvidos na pesquisa foram coletadas com o sistema de coleta à vácuo em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante e em tubos sem anticoagulante. Após a coleta, as amostras foram identificadas com número para garantir a confidencialidade. O material foi imediatamente centrifugado a 3000 r.p.m.

e o *buffy-coat* e soro foram aliquotados em tubos tipo *ependorf* e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

#### 4.6 POLIMORFISMO GENÉTICO CCR5 $\Delta$ 32

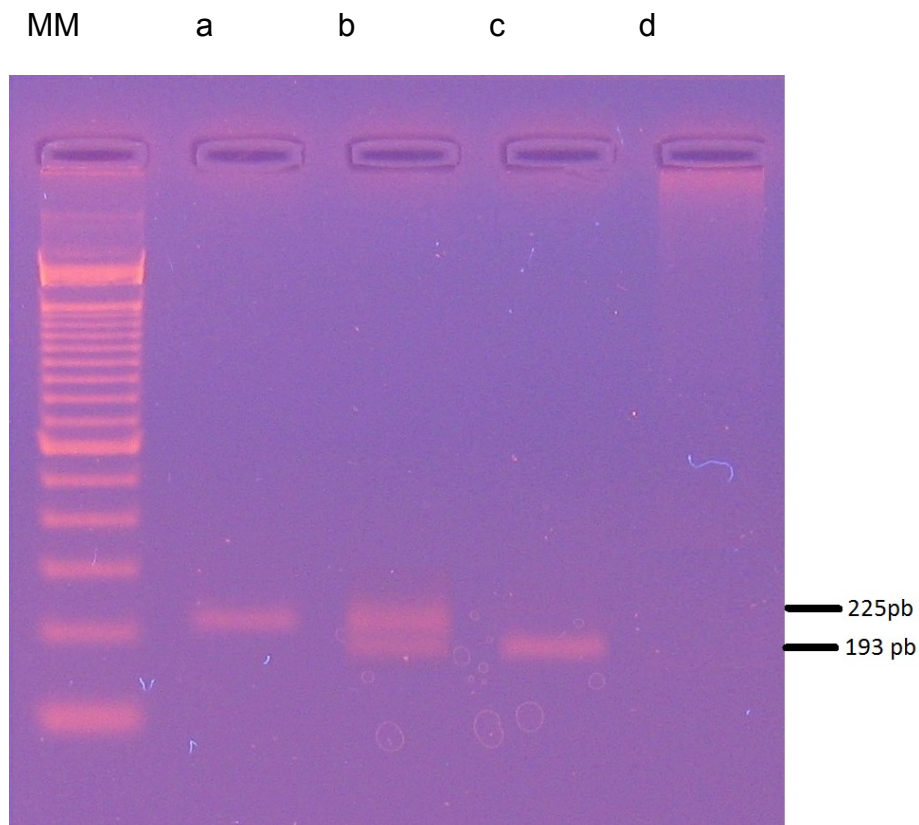
O DNA genômico foi extraído com o kit de extração de DNA Biopur (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Paraná, Brasil) de acordo com instruções do fabricante, com algumas modificações, como o volume de *buffy-coat* utilizado (200 $\mu\text{L}$ ) e a temperatura do tampão de eluição ( $70^{\circ}\text{C}$ ). A presença e integridade do DNA extraído foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado na presença de luz UV, comparado a um DNA padrão.

O gene *CCR5* foi amplificado utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com dados descritos na literatura (KAIMEN-MACIEL et al., 2007; CARVALHO et al., 2013). Os *primers* foram desenhados de acordo com a sequência depositada no *GenBank*: AF009962 (OLIVEIRA et al., 2007). A sequência usada para o *primer-sense* foi 5'-ACC AGA TCT CAA AAA GAA-3' e para o *primer-antisense* foi 5'-CAT GAT GGT GAA GAT AAG CTT CA-3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 0,15mM de cada primer, 1,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,1mM de dNTP (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,25U da enzima DNA polimerase recombinante diluída em seu tampão (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e 80 a 100 ng da amostra de DNA.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems, Thermocycler Veriti, ABI PRISM™, Foster City, CA, USA), com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ ; seguido por 37 ciclos de 45 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$  para desnaturação, 45 segundos a  $58^{\circ}\text{C}$  para o anelamento e 45 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$  para extensão; e 10 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$  para a extensão final. Um controle negativo (sem amostra de DNA) foi incluído em cada bateria de PCR. Os fragmentos do gene *CCR5* amplificados foram avaliados por meio da eletroforese em gel de agarose a 3%, utilizando um marcador de 100 pb (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), corado com brometo de etídio e visualizado em presença de luz UV através do sistema L-PIX HE (Loccus Biotecnology, Cotia, São Paulo, Brasil).

O alelo selvagem foi detectado como um fragmento de 225 pb e o alelo variante *CCR5* $\Delta$ 32 foi detectado como um fragmento de 193 pb.

**Figura 1** – Perfil eletroforético dos fragmentos de amplificação do gene *CCR5*. Eletroforese em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio. MM: Marcador Molecular de 100 pb; a: genótipo homocigoto para o alelo selvagem (*CCR5/CCR5*); b: genótipo heterocigoto (*CCR5/CCR5* $\Delta$ 32); c: genótipo homocigoto para o alelo em deleção (*CCR5* $\Delta$ 32/*CCR5* $\Delta$ 32); d: controle negativo



#### 4.7 MARCADORES LABORATORIAIS

Os níveis séricos de fatores do complemento C3 e C4 foram determinados por técnica de nefelometria (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany), segundo protocolo e valores de referência do fabricante. Anticorpos autoimunes contra antígenos celulares, anteriormente denominado fator antinuclear (FAN) foram determinados por imunofluorescência indireta, usando células HEp-2 (IFI-ANA-HEp 2-IgG, Viro-Immun-Labor-Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) sendo considerado significativos valores maiores ou iguais a 1:160. Registrou-se, também, o padrão de fluorescência obtido nesta reação,

segundo o III Consenso Brasileiro para Pesquisa em células HEp-2 (FAN) (DELLAVANCE et al., 2009). Anticorpos anti-dsDNA foram determinados por método de imunofluorescência indireta usando como substrato fixado na lâmina o protozoário *Critidia lucilliae* (Anti-DNA Imuno-COM, WAMA Diagnóstica, São Carlos, São Paulo, Brasil). Foram considerados significativos valores maiores ou iguais a 1:10. A contagem de leucócitos foi realizada por método automatizado padronizado no Setor de Exames Hematológicos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Londrina.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no Programa *Graph Pad Prism 5.0* (*GraphPad Software Inc.*; San Diego, CA). Variáveis categóricas foram analisadas usando Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado, e expressas em valores absolutos (n) e relativos (%). Os valores de p foram corrigidos ( $p_{corr}$ ) multiplicando-se pelo número de comparações, para verificação das variáveis independentemente associadas. Variáveis contínuas foram analisadas usando teste de Mann-Whitney e expressas em mediana e intervalo de interquartis (25%-75%). A *odds-ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% também foram registrados. Todos os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos foram descritos e discutidos no Artigo 1.

**ARTIGO 1:**

**CCR5 $\Delta$ 32 (rs333) polymorphism is a genetic marker for susceptibility, prognosis, and clinical course of systemic lupus erythematosus in Brazilian woman patients.**

Thiago Hissnauer Leal Baltus<sup>1</sup>, Ana Paula Kallaur<sup>1</sup>, Marcell Alisson Batisti Lozovoy<sup>2</sup>, Helena Kaminami Morimoto<sup>2</sup>, Francieli Delongui<sup>1</sup>, Tatiane Mayumi Veiga Iriyoda<sup>3</sup>, Andrea Name Colado Simão<sup>2</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>3</sup>Outpatient Clinic for Rheumatology, University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

**Correspondence:** Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina. Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: + 55-43-3371-2619. E-mail: [reiche@sercomtel.com.br](mailto:reiche@sercomtel.com.br)

**Running title:** CCR5 $\Delta$ 32 genetic polymorphism and SLE

## Abstract

Polymorphisms in the genes coding for chemokines and their receptors have been implicated in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases including autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE). Studies concerning the role of *CCR5Δ32* (rs333) in the pathogenesis of SLE reported contradictory results among different populations worldwide. The aim of this study was to determine the frequency of *CCR5Δ32* polymorphism and its association with the susceptibility and clinical course of SLE in a female Southern Brazilian population. One hundred and twenty patients and 132 healthy controls, age, ethnicity, and body mass index controlled, were recruited in this study. The SLE activity was determined using the SLEDAI and the *CCR5Δ32* genetic polymorphism was determined by polymerase chain reaction method. Among the patients, 65.8% were Caucasian, and 34.2% were non-Caucasian and both ethnic subgroups presented similar clinical and laboratory characteristics. The homozygosity for wild type allele, and heterozygosity for the *CCR5Δ32* allele were present in 84.2% and 15.8% patients, and in 96.2% and 3.8% healthy controls, respectively ( $p=0.0012$ , OR: 4.77, 95% CI: 1.72-13.24). The frequencies of the wild type *CCR5* allele and the variant *CCR5Δ32* allele were 0.9208 and 0.0792 among the SLE patients and 0.9810 and 0.0190 among the controls, respectively ( $p=0.0015$ , OR: 4.45, 95% CI: 1.65-12.20). Among Caucasians patients, the homozygosity for wild type allele, and heterozygosity for the *CCR5Δ32* allele were present in 81.0% and 19.0% patients, and in 96.0% and 4.0% controls, respectively ( $p=0.0025$ , OR: 5.56, 95% CI: 1.77-17.54). Overall and Caucasian patients carrying *CCR5/CCR5Δ32* genotype presented early age of onset of disease ( $p=0.0324$ ;  $p=0.0276$ , respectively), higher frequency of individuals with anti-dsDNA  $\geq 1:10$  titers ( $p=0.0484$ ;  $p=0.0025$ ,

respectively) and also presented higher levels of leucocytes ( $p=0.0506$ ;  $p=0.0471$ , respectively) than those carrying the wild type genotype. This polymorphism was associated with anti-dsDNA autoantibodies and may be considered an important factor in SLE development and renal involvement in these patients. The results underscore that the *CCR5* $\Delta$ 32 polymorphism might be associated with SLE susceptibility and may be a genetic marker related to clinical course of the disease in Brazilian Caucasian female.

**Keywords:** chemokine receptor 5 (CCR5), *CCR5* $\Delta$ 32, systemic lupus erythematosus, genetic polymorphism, anti-dsDNA,

## Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic multifactorial inflammatory autoimmune disease, clinically heterogeneous and genetically complex, characterized by widespread breakdown of immune tolerance to self-antigens (VYSE; KOTZIN, 1998; TSAO, 2002). The disease affects people worldwide, its incidence and prevalence is higher among women than men, and varies between countries. The prevalence rates ranges from 20 to 150/100,000 persons with the highest prevalence reported in Brazil (GARCÍA-CARRASCO et al., 2013).

Although the SLE pathogenesis remains unclear, with an involvement of genetics and environmental factors, several studies have demonstrated that the chemokines and their receptors are also implicated in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases including autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, multiple sclerosis, and SLE. Different levels of chemokine and their receptors expression may modify these autoimmune disease susceptibility, progression, and severity (GHORBAN et al., 2013; GUERGNON; COMBADIÈRE, 2012).

Chemokines are a family of proteins that play an important role in immunoregulatory and inflammatory processes. The CC chemokines are typically chemoattractant for inflammatory cells, and are also associated with T-lymphocyte polarization hence different T cells subsets express different receptors, (for example, Th1 cell subset express CCR5 and CXCR3, and Th2 cell subset express CCR4 and CCR8) (MORÁN et al., 2013).

CCR5 is a seven-transmembrane heptahelical chemokine receptor associated with G-protein and is expressed in a wide range of cells of the immune system,

(MACK et al., 1999; IMAI et al., 1999; MURPHY et al., 2000), and also a wide range of chemokine agonistic ligands, such as CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES) (MORÁN et al., 2013). The *CCR5* gene is located on short arm of human 3p21 chromosome and several genetic polymorphisms have been described in this gene (reviewed by REICHE et al., 2007). One of them is the deletion of 32 base pairs (bp) in the intron 3 of the *CCR5* (named *CCR5* $\Delta$ 32, rs333) that results in a frame shift, creating a premature stop codon and leading to a non-functional protein that fails to reach the cell surface. Consequently, in homozygous individuals there is absence of *CCR5* expression, while in heterozygous individuals there is a reduced *CCR5* expression in the cell surface (SAMSON et al., 1996).

Homozygosity for *CCR5* $\Delta$ 32 showed a relative resistance against human immunodeficiency infection type 1 (HIV-1) since the *CCR5* is a co-receptor for the macrophage-tropic strain of HIV-1 to entry in the host cell (SAMSON et al., 1996; DRAGIC et al., 1996; DENG et al., 1996). Homozygosity for *CCR5* $\Delta$ 32 also showed a protective effect against rheumatoid arthritis (POKORNY et al., 2005; KOHEM et al., 2007; MARTENS et al., 2009), and the *CCR5* $\Delta$ 32 allele might be involved in protection to the development of primary Sjogren's syndrome (PETREK et al., 2000), multiple sclerosis (GADE-ANDALOVU et al., 2004), sickle cell anemia (CHIES et al., 2001; VARGAS et al., 2005), Chron's disease (HERFARTH et al., 2001), and juvenile idiopathic arthritis (SCHEIBEL et al., 2008),

Previous studies concerning the role of *CCR5* $\Delta$ 32 in the pathogenesis of SLE reported contradictory results among different populations worldwide. While some results showed an association with protective effect for disease susceptibility

(SCHAUREN et al., 2013), others did not confirm this effect (AGUILAR et al., 2003; MAMTANI et al., 2008).

Therefore, the aim of this study was to determine the association of the *CCR5Δ32* polymorphism with SLE susceptibility and clinical course in a cohort from Southern Brazilian population.

## **Material and Methods**

The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committee of the State University of Londrina, and a written consent form was obtained from all of the individuals included in this study.

### **Patients and controls**

A total of 120 unrelated female SLE patients diagnosed according to the American College of Rheumatology criteria for SLE (HOCHBERG, 1997) were consecutively recruited from the Rheumatology Outpatient Department of the Outpatient Clinical Hospital, State University of Londrina, Paraná State, Southern Brazil. As control group, 132 unrelated female healthy blood donors, age, ethnicity, and body mass index controlled, from the same region of the SLE patients, were recruited from the Blood Bank of Londrina.

The demographic and clinical data were obtained through a standard questionnaire and medical records. The anthropometric measurements evaluated were body weight (measured to the nearest 0.1 kg using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes) and height (measured to the nearest 0.1 cm using a stadiometer). BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

Disease activity was assessed using the SLE Disease Activity index (SLEDAI) (BOMBARDIER et al., 1992). The serum levels of C3 (mg/dL) and C4 (mg/dL) were determined using nephelometer method, antinuclear antibodies (ANA) were quantified using indirect immunofluorescence with Hep2 cells as substrate (IFI-ANA-HEp 2-IgG, Viro-Immun-Labor-Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and were considered significant when titers  $\geq 1:160$ , anti-dsDNA antibodies were quantified using indirect immunofluorescence with *Crithidia luciliae* as substrate (Anti-DNA Imuno-COM, WAMA Diagnóstica, São Carlos, São Paulo, Brazil) and were considered significant when titers  $\geq 1:10$ , and peripheral white blood cells count (cells/mm<sup>3</sup>) were quantified using an automatic method. Clinical manifestations and therapeutic data were obtained from medical records.

### **CCR5 genotyping**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells, using a commercially available kit (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's protocol. A fragment of the *CCR5* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) as previously reported (KAIMEN-MACIEL et al., 2007; CARVALHO et al., 2013). The PCR products were analyzed by electrophoresis in 3% agarose gels and visualized on an ultraviolet transilluminator after staining with 1% ethidium bromide. Using this method, the wild-type allele produces one fragment of 225 bp, and the  $\Delta 32$  allele produces a fragment of 193 bp. One negative control (no added DNA) was included in each set of reaction to avoid potential misgenotyping.

### **Statistical analysis**

The statistical analysis was performed using Graph Pad Prism version 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Categorical variables were analyzed

using a chi-square test (or Fisher Exact test when appropriate), and they are expressed as absolute number (n) and percentage (%). Continuous variables were analyzed using the Mann-Whitney test, and they are expressed as median, range, and interquartile range (IQR) 25%-75%. The odds ratio and confidence interval (CI) 95% were also determined. The results were considered significant when  $p < 0.05$ . To determine which factors were independently associated with the *CCR5Δ32* polymorphism, the variables with a  $p < 0.20$  in the univariate analyses and those values with supposed clinical relevance or previous data in the literature were included in the multivariate logistic regression model. The multivariate analyses were evaluated using the Graph Pad InStat version 3.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

To obtain a more homogeneous group of patients, only female SLE patients were included in the study, divided in Caucasian and non-Caucasian subgroups for the analyses. Among the 120 SLE patients, 79 (65.8%) were Caucasian, and 41 (34.2%) were non-Caucasian ( $p = 0.1101$ ). The median age (IQR) of overall patients was 37.0 (31.0 - 44.0). The median age (IQR) of Caucasian and non-Caucasian SLE patients was 37.0 (31.0 – 44.0) years and 39.0 (29.0 – 50.0) years, respectively; and did not differ from Caucasian and non-Caucasian controls (data not shown).

Baseline demographic, clinical and laboratory characteristics according to the ethnicity of SLE patients are summarized in Table 1. No significant differences for any of these variables across the ethnicity of them were observed ( $p > 0.05$ ). Caucasian and non-Caucasian SLE patients presented a median age at onset of disease of 30.0 (19.0 – 39.0) years and 33.0 (20.0 - 39.0) years, respectively, with

the disease duration of 10 (4.0 – 15.0) years and 10 (4.0 – 14.0) years, respectively. Overall, considering both ethnic groups, most of them presented SLEDAI  $\leq 3$  (91/75.8%), C3  $\geq 90$  mg/dL (98/81.7%), C4  $\geq 10$  mg/dL (105/87.5%), ANA  $\geq 1:160$  (95/79.2%), and anti-dsDNA  $\geq 1:10$  (31/25.8%). Regarding the therapy, both ethnic subgroups used similarly corticosteroids (102/85.0%) and anti-malarial (44/36.7%); immunosuppressor drugs (63/52.5%). The most frequent clinical and/or laboratorial characteristics in Caucasian and non-Caucasian SLE patients were nephritis (27/22.5%), arthritis (11/9.2%), alopecia (8/6.7%), proteinuria (8/6.7%), malar rash (3/2.5%), and hematuria (1/0.83%).

The genotypes distribution and allelic frequency of *CCR5* $\Delta$ 32 polymorphism obtained from patients differed from those from controls (Table 2). The homozygosity for wild type allele, and heterozygosity for the *CCR5* $\Delta$ 32 allele were present in 101 (84.2%) and 19 (15.8%) patients, and in 127 (96.2%) and 5 (3.8%) healthy controls, respectively ( $p=0.0012$ , OR: 4.77, 95% CI: 1.72-13.24). The frequencies of the wild type *CCR5* allele and the variant *CCR5* $\Delta$ 32 allele were 0.9208 and 0.0792 among the SLE patients and 0.9810 and 0.0190 among the controls, respectively ( $p=0.0015$ , OR: 4.45, 95% CI: 1.65-12.20) (Table 2).

*CCR5* $\Delta$ 32 genotype frequencies observed among the SLE patients and controls were in Hardy-Weinberg Equilibrium in overall patients, both ethnic subgroups, and controls ( $p>0.05$ ). Among the Caucasian cohort, the *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32 genotype and *CCR5* $\Delta$ 32 allele frequencies were higher in patients than healthy controls; and it was significantly associated with presence of SLE ( $p = 0.0025$  and  $p = 0.0032$ , respectively). The presence of *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32 genotype or *CCR5* $\Delta$ 32 allele was associated with 5.56-fold and 5.09-fold, respectively, more likely to develop SLE (Table 2). Among the non-Caucasian cohort, the *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32

genotype and *CCR5* $\Delta$ 32 allele frequencies did not differ between patients and healthy controls ( $p = 0.3729$  and  $p = 0.3813$ , respectively), and was not associated with the presence of SLE (data not shown).

Factors such as age and BMI were controlled for clinical and laboratorial SLE characteristics analysis according to *CCR5* $\Delta$ 32 polymorphism among Caucasian and non-Caucasian patients ( $p > 0.05$ ). Overall patients bearing the *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32 genotype presented early age of onset of disease ( $p=0.0324$ ), higher frequency of individuals with anti-dsDNA  $\geq 1:10$  titers ( $p = 0.0484$ ) and a trend of higher levels of leucocytes ( $p=0.0506$ ), when compared with patients carrying the *CCR5/CCR5* genotype. When compared by ethnicity, only Caucasian patients carrying *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32 genotype presented significant results, as early age of onset of disease ( $p = 0.0276$ ), higher frequency of individuals with anti-dsDNA  $\geq 1:10$  titers ( $p = 0.0025$ ), higher levels of leucocytes ( $p = 0.0471$ ), and higher frequency of treatment with antimalarials ( $p = 0.0480$ ), compared with wild homozygous genotype (Table 3).

Among the Caucasian SLE patients, an increased frequency of individuals with nuclear homogeneous and cytoplasmic fluorescent patterns in ANA test was observed among those carrying the *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32 genotype, while an increased frequency of individuals with speckled nuclear and centromere nuclear fluorescent patterns was observed among those carrying *CCR5/CCR5* genotype ( $p = 0.0028$ ) (Table 3). However, after correction of multiple comparisons, *CCR5* $\Delta$ 32 remained associated only with the anti-dsDNA antibodies.

No difference was observed in the disease duration, SLEDAI, C3 and C4 serum levels, ANA positivity, treatment with corticosteroids or immunosuppressors

according to the *CCR5Δ32* polymorphism ( $p>0.05$ ). However, the treatment with anti-malarial agents was more frequent among the Caucasian patients carrying the *CCR5Δ32* allele ( $p=0.048$ ) (Table 3). Among the non-Caucasian SLE patients, clinical and laboratorial characteristics did not differ according to the *CCR5Δ32* polymorphism ( $p > 0.05$ ) (data not shown).

**Table 1** Baseline demographic, clinical, and laboratorial characteristics of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) from Southern Brazil, according to their ethnicity

Characteristics	Total (n = 120)	Caucasian	SLE	Non-Caucasian	p value
		patients (n=79)		SLE patients (n=41)	
Age at onset of disease (years)	30.0 (19.0 – 39.0)	30.0 (19.0-39.0)		33.0 (20.0-39.0)	
Disease duration (years)	10.0 (4.0 – 15.0)	10.0 (4.0-15.0)		10.0 (4.0-14.0)	
SLEDAI	0.0 (0.0 – 3.5)	0.0 (0.0-2.0)		0.0 (0.0-3.5)	
SLEDAI n (%)					
≤3	91 (75.8)	60 (75.9)		31 (75.6)	
>3	29 (24.2)	19 (34.1)		10 (24.4)	
C3 (mg/dL)		114.0 (97.2-130.0)		115.0 (96.5-131.0)	
C3 (mg/dL) n (%)					
< 90 mg/dL	22 (18.3)	13 (16.5)		9 (21.9)	
≥ 90 mg/dL	98 (81.7)	66 (83.5)		32 (78.1)	
C4 (mg/dL)		19.1 (13.3-25.1)		20.2 (14.5-25.6)	
C4 (mg/dL) n (%)					
< 10 mg/dL	15 (12.5)	11 (13.9)		4 (9.7)	
≥ 10 mg/dL	105 (87.5)	68 (86.1)		37 (90.3)	
ANA n (%)					

<1:160	25 (20.8)	18 (22.7)	7 (17.1)
≥ 1:160	95 (79.2)	61 (77.2)	34 (82.9)
ANA patterns n (%)			
Nuclear speckled	61 (50.8)	39 (49.4)	22 (53.6)
Nuclear homogeneous	51 (42.5)	36 (45.6)	15 (36.6)
Citoplasmic	4 (3.3)	2 (2.5)	2 (4.9)
Nuclear centromere	2 (1.6)	2 (2.5)	0 (0.0)
Nucleolar	2 (1.6)	0 (0.0)	2 (4.9)
Anti-dsDNA n (%)			
<1:10	89 (74.2)	59 (74.7)	30 (73.2)
≥ 1:10	31 (25.8)	20 (25.3)	11 (26.8)
Therapy n (%)			
Corticosteroids	102 (85.0)	65 (82.3)	37 (90.2)
Immunosuppressors	63 (52.5)	48 (60.8)	15 (36.6)
Anti-malarial agentes	44 (36.7)	30 (37.9)	14 (34.1)
Corticosteroids (mg/day)		10.0 (5.0-20.0)	15.0 (6.3-20.0)
Clinical manifestation n(%)			
Malar rash	3 (2.5)	3 (3.8)	0 (0.0)
Arthritis	11 (9.2)	10 (12.6)	1 (2.4)
Nephritis	27 (22.5)	17 (21.5)	10 (24.4)
Alopecia	8 (6.7)	8 (10.1)	0 (0.0)

Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) or median and interquartile range (25%-75%); SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; C3: complement 3; C4: complement; anti-dsDNA: anti-double stranded DNA antibodies; ANA: antinuclear antibodies. Categorical variables were analyzed using a chi-square test (or Fisher Exact test when appropriate), and continuous variables were analyzed using the Mann-Whitney test.

All the variables presented results of  $p > 0.05$

**Table 2** Frequency of chemokine 5 receptor delta 32 (*CCR5*Δ32 – rs333) polymorphism obtained from SLE patients and controls, according to their ethnicity

	Overall <i>CCR5</i> Δ32 polymorphism				Caucasian female <i>CCR5</i> Δ32 polymorphism			
	Healthy controls (n=132) n (%)	SLE patients (n=120) n (%)	p value	Odds Ratio (95% CI)	Healthy controls (n=99) n (%)	SLE patients (n=79) n (%)	p value	Odds Ratio (95% CI)
<i>CCR5/CCR5</i>	127 (96.2)	101 (84.2)	0.0012 <sup>a</sup>	4.77	95 (96.0)	64 (81.0)	0.0025 <sup>a</sup>	5.56
<i>CCR5/CCR5</i> Δ32	5 (3.8)	19 (15.8)		(1.72-13.24)	4 (4.0)	15 (19.0)		(1.76 –17.54)
<i>CCR5</i> allele	0.9810	0.9208	0.0015 <sup>a</sup>	4.45	0.9798	0.9051	0.0032 <sup>a</sup>	5.09
<i>CCR5</i> Δ32 allele	0.0190	0.0792		(1.65-12.20)	0.0202	0.0949		(1.65–15.66)

Data were expressed absolute number (n) and percentage (%). CI: confidence interval

<sup>a</sup>Fisher Exact Test (p<0.05).

*CCR5*: chemokine 5 receptor; SLE: systemic lupus erythematosus;

*CCR5/CCR5* wild-type genotype; *CCR5/CCR5*Δ32: 32 base-pair deletion in heterozygosis.

The distribution of genotypes and allelic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls (p > 0.05).

**Table 3** Baseline demographic, clinical, and laboratorial characteristics of female systemic lupus erythematosus patients from Southern Brazil, according to chemokine 5 receptor delta 32 (*CCR5* $\Delta$ 32) polymorphism and their ethnicity

Characteristic	Overall SLE patients (n=120)			Caucasian female SLE patients (n=79)		
	<i>CCR5/CCR5</i> (n=101)	<i>CCR5/CCR5</i> $\Delta$ 32 (n=19)	p value	<i>CCR5/CCR5</i> (n=64)	<i>CCR5/CCR5</i> $\Delta$ 32 (n=15)	p value
Age (years)	40.0 (30.3-49.8)	36.0 (27.3-50.5)	0.3985 <sup>b</sup>	40.0 (30.0-50.0)	34.0 (26.3-50.5)	0.3817 <sup>c</sup>
Age at onset of disease (years)	31.5 (20.8-39.0)	23.5 (13.8-34.5)	0.0324 <sup>b</sup>	31.0 (22.0-39.5)	21.0 (9.75-34.5)	0.0276 <sup>c</sup>
Disease duration (years)	10.0 (4.0-14.3)	5.5 (3.1 -16.0)	0.3793 <sup>b</sup>	10.0 (4.0-14.0)	5.5 (1.5-16.5)	0.3526 <sup>c</sup>
SLEDAI	0.0 (0.0-2.8)	0.0 (0.0-4.0)	0.7858 <sup>b</sup>	0.0 (0.0-2.0)	0.0 (0.0-5.5)	0.9334 <sup>c</sup>
SLEDAI n (%)						
≤3	78 (77.2)	13 (68.4)	0.5303 <sup>a</sup>	49 (76.6)	10 (66.7)	0.5118 <sup>b</sup>
>3	23 (22.8)	6 (31.6)		15 (23.4)	5 (33.3)	
C3 (mg/dL)	114.0 (97.8-129.0)	122.0 (93.2-141.3)	0.7294 <sup>b</sup>	113.5 (97.2-127.5)	123.0 (96.2-141.3)	0.3840 <sup>c</sup>
C3 (mg/dL) n (%)						
< 90	20 (19.8)	2 (10.5)	0.7321 <sup>a</sup>	13 (40.6)	1 (6.7)	0.2798 <sup>b</sup>
≥90	81 (80.1)	17 (89.5)		51 (59.4)	14 (93.3)	

C4 (mg/dL)	19.8 (13.4-25.3)	20.6 (14.9-29.7)	0.5917 <sup>b</sup>	18.6 (13.3-25.1)	21.1 (12.6-27.3)	0.7242 <sup>c</sup>
C4 (mg/dL) n (%)						
< 1:10	13 (12.9)	2 (10.5)	1.000 <sup>a</sup>	9 (14.1)	3 (20.0)	0.6894 <sup>b</sup>
≥ 1:10	88 (87.1)	17 (89.5)		55 (85.9)	12 (80.0)	
ANA n (%)						
< 1:160	19 (18.8)	5 (26.3)	0.7414 <sup>a</sup>	14 (21.9)	2 (13.3)	0.7228 <sup>b</sup>
≥ 1:160	82 (81.2)	14 (73.7)		50 (78.1)	13 (86.7)	
ANA pattern n (%)						
Nuclear speckled	51 (50.5)	4 (21.1)		36 (56.3)	3 (20.0)	
Nuclear homogeneous	44 (43.5)	13 (68.4)		26 (40.6)	10 (66.7)	
Nuclear centromere	2 (2.0)	0 (0.0)	0.3268 <sup>a</sup>	2 (3.1)	0 (0.0)	0.0028 <sup>a</sup>
Citoplasmic	2 (2.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	2 (13.3)	
Nucleolar	2 (2.0)	2 (10.5)		0 (0.0)	0 (0.0)	
Anti-dsDNA n (%)						
< 1:10	78 (77.2)	10 (52.6)	0.0484 <sup>a</sup>	52 (81.3)	6 (40.0)	0.0025 <sup>b</sup>
≥ 1:10	23 (22.8)	9 (47.4)		12 (18.7)	9 (60.0)	
Leukocytes (x10 <sup>3</sup> cell/μL)	5.8 (4.5-7.7)	7.5 (4.8-9.8)	0.0506 <sup>b</sup>	5.7 (4.7-7.6)	8.0 (5.7-9.5)	0.0471 <sup>c</sup>

Corticosteroids (mg/day)	10.0 (5.0-20.0)	20.0 (6.3-30.0)	0.1897 <sup>a</sup>	10.0 (5.0-20.0)	15.0 (5.0-30.0)	0.4099 <sup>c</sup>
Corticosteroids n (%)						
Yes	88 (80.0)	14 (12.7)	1.000 <sup>a</sup>	55 (85.9)	10 (66.7)	0.1264 <sup>b</sup>
No	7 (6.4)	1 (0.9)		9 (14.1)	5 (33.4)	
Anti-malarial agents n (%)						
Yes	36 (32.7)	9 (8.2)	0.1770 <sup>a</sup>	60 (93.8)	13 (86.7)	0.0480 <sup>b</sup>
No	58 (52.7)	7 (6.4)		4 (6.2)	2 (32.3)	
Immunosuppressors n (%)						
Yes	51 (46.4)	11 (10.0)	0.4143 <sup>a</sup>	42 (65.6)	10 (66.7)	1.000 <sup>b</sup>
No	43 (39.1)	5 (4.5)		22 (34.4)	5 (33.3)	

---

Data were expressed absolute number (n) and percentage (%) or median and interquartile range (IQR, 25%-75%).

<sup>a</sup>Chi-Square Test, <sup>b</sup>Fisher Exact Test, <sup>c</sup>Mann-Whitney Test (p<0.05).

SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; C3: complement 3; C4: complement; anti-dsDNA: anti-double stranded

DNA antibodies; ANA: antinuclear antibodies; CCR5: chemokine 5 receptor; SLE: systemic lupus erythematosus;

CCR5/CCR5: wild-type genotype; CCR5/CCR5Δ32: 32 base-pair deletion in heterozygosis.

## Discussion

Among the overall patients, the *CCR5/CCR5Δ32* genotype and the *CCR5Δ32* allele were significantly associated with SLE, exhibiting odds ratios of 4.77 and 4.45, respectively. The heterozygous genotype and variant allele also were associated with susceptibility to disease in Caucasian patients, with odds ratios of 5.56 and 5.05, respectively. Moreover, SLE patients carrying the *CCR5/CCR5Δ32* genotype presented clinical and laboratorial characteristics that are associated with the severity of the disease, such as earlier age of onset of the disease ( $p=0.0324$ ), higher frequency of anti-dsDNA  $\geq 1:10$  ( $p=0.0484$ ), and higher levels of leukocytes ( $p=0.0506$ ) compared with those SLE patients carrying the *CCR5/CCR5* genotype.

The baseline demographic and clinical characteristics of SLE patients evaluated in the present cohort are consistent with previous studies, such as the occurrence of SLE in young females and low SLEDAI (AGUILAR et al., 2003; CARVALHO et al., 2013; SCHAUREN et al., 2013). Although SLE is more frequent in Asiatic and Black individuals, our cohort is composed predominantly by Caucasians (IBGE, 2010). The low SLEDAI presented by the most of the SLE patients is probably a result of the treatment presented by them at the time of inclusion in the study.

The overall distribution of genotype and allele frequencies are similar with previous studies carried out in Brazilian (SCHAUREN et al., 2013), and other ethnics SLE patient cohorts (CARVALHO et al., 2013; MAMTANI et al., 2008; AGUILAR et al., 2003). However, contradictory results were found in these previous studies. Schauen et al. (2013) carried out a study in Southern Brazilian population, and showed that the *CCR5Δ32* allele is a protective factor for SLE in European-derived patients, although they observed that patients with the *CCR5Δ32* polymorphism had higher chances to develop lupus nephritis type IV. Carvalho et al. (2013) also

showed a protective effect of the *CCR5*Δ32 polymorphism against SLE development among Portuguese patients. Martens et al. (2010) and Aguilar et al (2003) found no association between *CCR5*Δ32 allele and disease susceptibility, however Aguilar et al. suggested the existence of a slight increase in the production of antibodies against double-stranded DNA (anti-dsDNA) in the development of nephritis and in a more severe outcome in those carrying the *CCR5*Δ32 allele. Mamtani et al. (2008) demonstrated an increased risk of developing nephritis in patients from the United States and Colombia in individuals carrying CCL3L1/*CCR5* haplotypes that included the *CCR5*Δ32 allele. This study also reported that the *CCR5*Δ32 allele is a genetic marker related to SLE severity associated with high autoantibodies titers and lupus nephritis. In the present cohort of SLE patients, the *CCR5*/*CCR5*Δ32 genotype and the *CCR5*Δ32 allele were associated with presence of SLE in Caucasians, but not in non-Caucasian individuals.

The Brazilian population is one of the most genetically heterogeneous worldwide, and the most of Brazilians are European-descendants (SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2012). However, the frequency of *CCR5*Δ32 allele observed among the patients and controls of the present study did not differ from previous studies carried out worldwide. This polymorphism is present in several European populations at a frequency of about 5-16%, while it is almost absent in some ethnic groups, such as African, Japanese, and Chinese (SAMSON *et al.*, 1996; MAGIEROWSKA *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2003). In Brazilian population, the overall frequency of *CCR5*Δ32 variant allele was 0.0418 and varied in different ethnic groups, such as 0.0504 among Caucasians, 0.0280 among Browns, and absent in Blacks and Asians (REICHE *et al.*, 2008).

It is important to observe that the *CCR5*Δ32 allele variant was not originally present in native African populations and that its presence in African-derived subjects results from miscegenation (MARTINSON et al., 1997), which can explain the results of our study regarding the low frequency of this allele among non-Caucasian SLE patients.

Chemokines play key roles in the activation and regulation of immune cell migration which is important in the pathogenesis of autoimmune diseases. CCR5 is a receptor expressed by several immune cells, and is upregulated by proinflammatory cytokines (GHORBAN et al., 2013). Inflammatory process in SLE is initiated by lymphocytic infiltration in to tissue spaces, and the biological distribution of lymphocytes appears to be determined by the expression of chemokines receptors, including CCR5 (FURUICHI et al., 2000; HOFFMAN, 2001). It has been established that the deletion of 32 pb of the *CCR5* gene leads to a decreased expression and dysfunction of CCR5 receptor (ARABABADI et al., 2009).

The unclear role of CCR5 in SLE pathogenesis may be due to the presence of this receptor in cells with different functions in the immune system, for instance T helper and Treg cells. The presence of CCR5 in the surface of the immune system cells helps their migration to tissues, promoting inflammation. On the other hand, CCR5 can also be involved in resolution of inflammation through some possible mechanisms (DOODES et al., 2009; DOBACZEWSKI et al., 2010).

Some hypothesis are discussed to explain the involvement of the *CCR5*Δ32 polymorphism with the development and severity of SLE. First is CCR5 signaling and inhibiting matrix metalloproteinases (MMPs) activity. MMPs are a group of enzymes involved in degradation of abundant extracellular matrix (ECM) components.

Proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and proinflammatory stimulus propagated by ICs deposition enhance MMPs synthesis, and their activity. In turn, this enhancement of MMPs results in matrix degradation of the glomerular basement membranes, leading to more ICs deposition and exposure of epitopes creating a vicious cycle of persisting inflammation that worsens severity of disease (TVEITA, 2008). Dobaczewski et al. (2010) observed that Treg CCR5<sup>+/+</sup> cells exhibited increased expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in comparison with CCR5<sup>-/-</sup> cells, in inflammation of infarcted patients. IL-10 downregulates the expression of proinflammatory cytokines, and consequently, inhibiting activity of MMPs. Based on these results, we hypothesized that the absence of CCR5 could impair the recruitment of Treg CCR5<sup>+/+</sup> cells to the glomeruli, with consequent reduction of IL-10 impairing the downregulation of MMPs and their renal damage.

Second, Turner et al. (2012) showed that the lack of CCR5 exacerbates the course of LN in terms of mononuclear cell recruitment, glomerular tissue injury, and proteinuria. Moreover, the renal CCL3 protein level, but not the mRNA level, as well as systemic CCL3, CCL4, and CCL5 protein levels and the lymphoproliferation in the spleen were upregulated in nephritic CCR5<sup>-/-</sup> mice. These results showed that the absence of CCR5 delayed *in vivo* clearance of CCL3 protein and the CCR5<sup>+/+</sup> cells scavenge CCR5 ligands and, thereby, lower local CCL3, CCL4, and CCL5 levels. This may be an additional mechanism for downregulation of the host's immune response exerted by the CCR5.

In the absence of CCR5<sup>+/+</sup> cells, CCL3, CCL4, and CCL5 can induce the recruitment of pathogenic monocytes and T-cells via the activation of their alternate receptor, CCR1, which is abundantly expressed on these cell types (BROMLEY et al., 2008), and in the CCR3 (GHORBAN et al., 2013). This augmented CCR1- and

CCR3-dependent infiltration of immune cells can lead to the exacerbate tissue injury, as shown in models of hepatic and renal inflammation (TURNER et al., 2008).

Third, the differential expression of chemokine receptor in Th1 and Th2 cells is important for the selective migration of a particular T cell subset, since the chemokines produced at the sites of inflammation play a major role in the recruitment of infiltration cells in the pathological lesions. CCR5 is preferentially expressed on Th1 cell (LOETSCHER et al., 1998) while CCR4 is preferentially expressed on Th2 cells (IMAI et al., 1999).

Moreover, Funauchi et al. (1998) showed that Th1-like cells producing interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) were decreased and Th2-like cells producing interleukin 4 (IL-4) and interleukin 10 (IL-10) were increased in the peripheral blood of SLE patients. Therefore, SLE patients carrying the *CCR5* $\Delta$ 32 present reduced expression of CCR5 in the cells surface and this could contribute to the imbalance of Th1/Th2 cells recruitment in the inflamed tissues, with a predominance of CD4<sup>+</sup> Th2 cells CCR4<sup>+</sup> (YAMADA et al., 2002). The CD4<sup>+</sup> CCR4<sup>+</sup> in peripheral blood might preferentially migrate into the renal tissue of the patients with lupus nephritis and induce a Th2 immune response with the production of autoantibodies, such as anti-dsDNA, contributing to the development and severity of the disease.

In our study, SLE patients carrying the *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32 genotype presented earlier age of onset of disease ( $p = 0.0324$ ), higher levels of anti-dsDNA antibodies ( $p = 0.0484$ ), and higher leukocyte counts than those carrying the wild type *CCR5* homozygous genotype ( $p = 0.0506$ ). These results are partially in agreement with a previous study carried out by Aguilar et al. (2003), who found no correlations

between *CCR5* polymorphism and age of onset of disease; however, when the SLE patients were stratified according to their clinical features, these authors demonstrated an increase in the frequency of individuals bearing *CCR5* $\Delta$ 32 among patients with anti-dsDNA antibodies, among patients with biopsy-proven nephritis, and a with higher median severity index than those carrying the *CCR5* wild-type allele (AGUILAR et al., 2003).

The results of the present study that SLE patients carrying the *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32 genotype presented higher severity of the disease is in agreement with the fact that increased anti-dsDNA is correlated with a renal involvement and with lupic nephritis, contributing to a worst evolution of disease (ISENBERG et al., 2007; CAMERON, 1999; ALBA et al., 2003).

In the present study, Caucasian SLE *CCR5/CCR5* $\Delta$ 32 carriers showed increased frequency of ANA with homogeneous nuclear pattern than those *CCR5/CCR5* carriers, which might be directly correlated with high frequency of anti-dsDNA antibodies. Lenert et al. (1993) and Frodlund et al. (2013) showed that homogeneous nuclear pattern is correlated with anti-dsDNA levels, and this pattern is the most common found in SLE patients.

The *CCR5* $\Delta$ 32 polymorphism has been evaluated in several diseases with different results: positive association with pulmonary sarcoidosis (PETREK et al., 2000) and myocardial infarction (GONZALEZ et al., 2001), and no association with Chron's disease (HERFARTH et al., 2001) and polymyalgia rheumatica (SALVARANI et al., 2000). Some conflicting results were described in rheumatoid arthritis (GÓMEZ REINO et al., 1999; GARRED et al., 1998) and asthma (HALL et al., 1999; MITCHELL et al., 2000; SANDFORD et al., 2001). Moreover, the actual role of the

$\Delta 32$  mutation in *CCR5* is confounded by factors, such as the patient's immunological status, other genetic polymorphisms, and epigenetic mechanisms. Individually or combined, all these factors can alter the response by a patient to the different immune system-related disease.

The *CCR5* is located together with other inflammatory chemokine receptor genes, and linkage with *CCR2* is particularly strong, as *CCR2* is located 17.5kb upstream of *CCR5*, and in the same orientation (SAMSON et al., 1996). This region shows weak but suggestive evidence of linkage to SLE in genome scan studies (WAKELAND et al., 2001). This cluster includes also *CCR1*, *CCR2*, *CCR3*, and *XCR1* (SAMSON et al., 1996; MAHO et al., 1999). *CCR2* and *CCR5* have been mapped very close to one another in this region (SMITH et al., 1997) and several genetic polymorphisms have been described in both chemokine receptors, with high density of single nucleotide polymorphisms.

Taken all together, *CCR5* $\Delta 32$  polymorphism might be associated with the presence of SLE and with increased frequency of anti-dsDNA antibodies, suggesting an important factor in SLE development and clinical course since these autoantibodies are involved in the lupus nephritis in Caucasians. In non-Caucasian subjects the *CCR5* polymorphism was not associated, probably as a result of the low frequency of the *CCR5* $\Delta 32$  allele among this population. The identification of a genotype of chemokine receptor polymorphisms may be used as a biomarker of the development and/or severity of an autoimmune disease specifically, such as SLE, and may be promising targets for therapeutics that taken into account the genetic profile of the individuals. These results suggests that, in women Brazilian patients and in Caucasian ethnicity, the *CCR5/CCR5* $\Delta 32$  genotype might be considered as a marker of susceptibility to SLE and a worse clinical development, with possibly renal

involvement by its association with anti-dsDNA, once this antibody is considered an important factor on humoral response of lupus nephritis. The results also highlight the lead for further studies concerning the influence of the CCR5 and other chemokines receptor polymorphisms and the effects of these molecules expression levels in the immune response in SLE patients.

### **Acknowledgments**

The study was supported by grants from Coordination for the Improvement of Higher Level of Education Personnel (CAPES) of Brazilian Ministry of Education; Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); and State University of Londrina (PROPPG). We thank the University Hospital of State University of Londrina for technical supports.

### **Conflict of Interest Statement**

All the authors declare that there is no conflict of interest.

### **References**

AGUILAR, F.; NÚÑES-ROLDÁN, A.; TORRES, B.; WICHMANN, I.; SÁNCHEZ-ROMÁN, J.; GONZÁLES-ESCRIBANO, M. F. et al., Chemokine Receptor CCR2/CCR5 Polymorphism in Spanish Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **J Rheumatol** v.30, n.8, p. 1770-1774, 2003.

ALBA, P.; BENTO, L.; CUADRADO, M. J.; KARIM, Y.; TUNGEKAR, M. F.; ABBS, I.; KHAMASHTA, M. A.; D'CRUZ, D.; HUGHES, G. R. V. et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. **Ann Rheum Dis** v.62, n.6, p. 556–560, 2003.

ARABABADI M K, N NAGHAVI, G HASSANSHAHI et al. 2009. Is CCR5-Delta32 mutation associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes? **Ann Saudi Med** v.29, p.413, 2009

BOMBADIER, C.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M. B.; CARON, D.; CHANG, C. H. et al. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index of lupus patients. The Committee on prognosis studies in SLE. **Arthritis Rheum** v.35, p.630-640, 1992.

BROMLEY, S. K.; MEMPEL, T. R.; LUSTER; A. D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. **Nat Immunol** v.9, p. 970-980, 2008.

CAMERON J. S.,Lupus Nephritis. **J Am Soc Nephrol** v.10, p. 413–424, 1999.

CARVALHO, C.; CALVISI, S. L.; LEAL, B.; BETTENCOURT, A.; MARINHO, A.; ALMEIDA, I.; FARINHA, F.; COSTA, P. P.; SILVA, B. M.; VASCONCELOS, C. et al. CCR5-Delta32: implications in SLE development. **Int J Immunogenet** v.0, p. 1-6, 2013.

CHIES, J. A.; NARDI, N. B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **Med Hypotheses** v.57, p. 46-50, 2001.

DENG, H.; LIU, R.; ELLMEIER, W.; CHOE, S.; UNUTMAZ, D.; BURKHART, M.; DI MARZIO, P.; MARMON, S.; SUTTON, R. E.; HILL, C. M.; DAVIS, C. B.; PEIPER, S. C.; SCHALL, T. J.; LITTMAN, D. R.; LANDAU, N. R. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature** v.381, n.6584, p. 661-666, 1996.

DOBACZEWSKI, M.; XIA, Y.; BUJAK, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.; FRANGOIANNIS, N. G. et al. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. **Am J Pathol** v.176, n.5, p. 2177-2187, 2010.

DOODES, P. D.; CAO, Y.; HAMEL, K. M.; WANG, Y.; RODEGHERO, R. L.; KOBEZDA, T.; FINNEGAN, A et al. CCR5 is involved in resolution of inflammation in proteoglycan-induced arthritis. **Arthritis Rheum** v.60, n.10, p. 2945-2953, 2009.

DRAGIC, T.; LITWIN, V.; ALLAWAY, G. P.; MARTIN, S. R.; HUANG, Y.; NAGASHIMA, K. A.; CAYANAN, C.; MADDON, P. J.; KOUP, R. A.; MOORE, J. P.; PAXTON, W. A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. **Nature** v.381, n.6584 p. 667-673, 1996.

FRODLUND, M.; DAHLSTRÖM, Ö.; KASTBOM, A.; SKOGH, T.; SJÖWALL C. et al. Associations between antinuclear antibody staining patterns and clinical features of systemic lupus erythematosus: analysis of a regional Swedish register. **BMJ Open** v.3, n.10, 2013.

FUNAUCHI, M.; IKOMA, S.; ENOMOTO, H.; HORIUCHI, A. et al. Decreased Th1-like and increased Th2-like cells in systemic lupus erythematosus. **Scand J Rheumatol** v.27, n.3, p. 219-224, 1998.

FURUICHI, K.; WADA, T.; SAKAI, N.; IWATA, Y.; YOSHIMOTO, K.; SHIMIZU, M.; KOBAYASHI, K.; TAKASAWA, K.; KIDA, H.; TAKEDA, S. I.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; YOKOYAMA, H. et al. Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. **Am J Nephrol** v.20, n.4, p. 291-299, 2000.

GADE-ANDAVOLU, R.; COMINGS, D. E.; MACMURRAY, J.; ROSTAMKHANI, M.; CHENG, L. S.; TOURTELLOTTE, W. W.; CONE, L. A. Association of CCR5 delta32 deletion with early death in multiple sclerosis. **Genet Med** v.6, n.3, p. 126-131, 2004.

GARCÍA-CARRASCO, M.; PINTO, C.M.; POLANO, I.E.; CERVERA, R., ANAYA J-M. Systemic lupus erythematosus. In: ANAYA, J-M.; SHOELFELD, Y.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; LEVY, R.A.; CERVERA, R. (eds). **Autoimmunity: from bench to bedside**. Bogota: El Rosario University Press, School of Medicine and Health Sciences CREA, p. 427-441), 2013.

GARRED, P.; MADSEN, H. O.; PETERSEN, J.; MARQUART, H.; HANSEN, T. M.; FREIESLEBEN-SØRENSEN, S.; VOLCK, B.; SVEJGAARD, A.; ANDERSEN, V. CC chemokine receptor 5 polymorphism in the rheumatoid arthritis. **J Rheumatol** v.25, p. 1462-1465, 1998.

GHORBAN, K.; DADMANESH, M.; HASSANSHAHI, G.; MOMENI, M.; ZARE-BIDAKI, M.; ARABABADI, M. K.; KENNEDY, D. Is the CCR5  $\Delta$  32 mutation associated with immune system-related diseases? **Inflammation** v.36, n.3 p. 633-642, 2013.

GÓMEZ-REINO, J. J.; PABLOS, J. L.; CARREIRA, P. E.; SANTIAGO, B.; SERRANO, L.; VICARIO, J. L.; BALSÀ, A.; FIGUEROA, M.; DE JUAN, M. D. et al. Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. **Arthritis Rheum** v.42, n.5, p. 989-992, 1999.

GONZÁLEZ, P.; ALVAREZ, R.; BATALLA, A.; REGUERO, J. R.; ALVAREZ, V.; ASTUDILLO, A.; CUBERO, G. I.; CORTINA, A.; COTO, E. et al. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. **Genes Immun** v.2, n.4, p. 191-195, 2001.

GUERGNON, J.; COMBADIÈRE, C. Role of chemokines polymorphisms in diseases. **Immunol Lett** v.145, p. 15-22, 2012.

HALL, I. P.; WHATLEY, A.; CHRISTE, G.; MCDOUGAL, C.; HUBBARD, R.; HELMS, P. J. Association of CCR5 delta 32 with reduced risk of asthma. **Lancet** v.354, p. 1264-1265, 1999.

HERFARTH, H.; POLLOK-KOPP, B.; GOKE, M.; PRESS, A.; OPPERMAN, M. Polymorphism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Chron's disease. **Immunol Lett** v.77, p. 113-117, 2001.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.40, p.1725, 1997.

HOFFMAN, R. W. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Front Biosci** v.6, 2001.

IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics. Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe. available in: [http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas\\_da\\_populacao/default\\_caracteristicas\\_da\\_populacao.shtm](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm). Accessed in November 20, 2013.

IMAI, T.; NAGIRA, M.; TAKAGI, S.; KAKIZAKI, M.; NISHIMURA, M.; , WANG, J.; GRAY, P. W.; MATSUSHIMA, K.; YOSHIE, O. et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. **Int Immunol** v.11, n.1, p. 81-88, 1999.

ISENBERG, D. A.; MANSON, J. J.; EHRENSTEIN, M. R.; RAHMAN, A. et al. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? **Rheumatol**; v.46, n.7, p. 1052–1056, 2007.

KAIMEN-MACIEL, D. R.; REICHE, E. M. V.; SOUZA, D. G. B.; COMINI, E. R. F.; BOBROFF, F.; MORIMOTO, H. K.; WATANABE, M. A. E.; OLIVEIRA, J. C. O.; MATSUO, T.; LOPES, J.; DONADI, E. A. et al. CCR5- $\Delta$ 32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis. **Int J Mol Med** v.20, p. 337-344, 2007.

KOHEM, C. L.; BRENOL, J. C.; XAVIER, R. M.; BREDEMEIER, M.; BRENOL, C. V.; DEDAVID, E.; SILVA, T. L.; DE CASTILHOS MELLO, A.; CAÑEDO, A. D.; NEVES, A. G.; CHIES, J. A. The chemokine receptor CCR5 genetic polymorphism and expression in rheumatoid arthritis patients. **Scand J Rheumatol** v.36, p. 359-364, 2007.

LENERT, P.; FELLE, D.; LENERT, G.; MITIĆ, I.; CURIĆ, S.; VODOPIVEC, S.; TEPAVCEVIĆ, P. et al. Immunologic characterization of autoreactivity to nuclear antigens in patients with systemic lupus erythematosus. **Med Pregl** v.46, n.5-6, p. 167-172, 1993.

LOETSCHER, P.; UGUCCIONI, M.; BORDOLI, L.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B.; CHIZZOLINI, C.; DAYER, J. M. et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes [letter]. **Nature** v.391, n.6665, p. 344-345, 1998.

MACK, M.; BRÜHL, H.; GRUBER, R.; JAEGER, C.; CIHAK, J.; EITER, V.; PLACHÝ, J.; STANGASSINGER, M.; UHLIG, K.; SCHATTENKIRCHNER, M.; SCHLÖNDORFF, D. Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusion of patients with different forms of arthritis. **Arthritis Rheum** v.42, p. 981-988, 1999.

MAGIEROWSKA, M.; LEPAGE, V.; BOUBNOVA, L.; CARCASSI, C.; DE JUAN, D.; DJOULAH, S.; EL CHENAWI, F.; GRUNNET, N.; HALLÉ, L.; IVANOVA, R.; JUNGGERMAN, M.; NAUMOVA, E.; PETRANY, G.; SONNERBORG, A.; STAVROPOULOS, C.; THORSBY, E.; VU-TRIEU, A.; DEBRÉ, P.; THEODOROU, I.; CHARRON, D. Distribution of the CCR5 gene 32 base pair deletion and SDF-3'A variant in healthy individuals from different populations. **Immunogenet** v.48, p. 417-419, 1998.

MAHO, A.; BENSIMON, A.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Mapping of the CCXCR1, CX3CR1, CCBP2 and CCR9 genes to the CCR cluster within the 3p21.3 region of the human genome. **Cytogenet Cell Genet** v.87, n.3-4 p.265-268, 1999.

MAMTANI, M.; ROVIN, B.; BREY, R.; CAMARGO, J. F.; KULKARNI, H.; HERRERA, M.; CORREA, P.; HOLLIDAY, S.; ANAYA, J. M.; AHUJA, S. K. et al. CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis** v.67, n.8, p. 1076-1083, 2008.

MARTENS, H. A.; GROSS, S.; STEEGE, G.; BROUWER, E.; BERDEN, J. H. M.; SEVAUX, R.; DERKSEN, R. H. W. M.; VOSKUYL, A. E.; BERGER, S. P.; NAVIS, G. J.; KALLENBERG, C. G. M.; BIJL, M. Lack of association of C-C chemokine receptor 5  $\Delta$ 32 deletion status with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, and disease severity. **J Rheumatol** v.37, n.11, 2010.

MARTENS, H. A.; KALLENBERG, C. G.; BIJL, M. et al. Role of CCR5 Delta32 bp deletion in RA and SLE. **Autoimmunity** v.42, n.4, p. 260-262, 2009.

MARTINSON, J. J.; CHAPMAN, N. H.; REES, D. C.; LIU, Y. T.; CLEGG, J. B. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat Genet** v.16, n.1, p. 100-103, 1997.

MITCHELL, T. J.; WALLEY, A. J.; PEASE, J. E.; VENABLES, P. J.; WILTSHIRE, S.; WILLIAMS, T. J.; COOKSON, W. O. Delta 32 deletion of CCR5 gene and association with asthma or atopy. **Lancet** v.356, p. 1491-1492, 2000.

MORÁN, G.A.G.; PARRA-MEDINA, R.; CARDONA, A. G.; QUINTERO-RONDEROS, P.; RODRIGUEZ, É. G. Cytokines, chemokines and growth factors. In: ANAYA J-M.; SHOELFELD Y.; ROJAS-VILLARRAGA A.; LEVY R.A.;CERVERA R. (eds). **Autoimmunity: from bench to bedside**. Bogotá: El Rosario University Press, School of Medicine and Health Sciences CREA, p. 133-168, 2013.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, L. F.; HEBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J. J.; POWER, C. A. International Union of Pharmacology. XXII Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev** v.52, p. 145-176, 2000.

PETREK, M.; GIBEJOVA, A.; DRABEK, J.; MRAZEK, F.; KOLEK, V.; WEIGL, E.; DU BOIS, R. M. CC chemokine receptor gene polymorphism in Czech patients with pulmonary sarcoidosis. **Am J Respir Crit Care Med** v.162, p. 1000-1003, 2000.

POKORNY, V.; MCQUEEN, F.; YEOMAN, S.; MERRINAN, M.; MERIMAN, A.; HARRISON, A.; HIGTON, J.; MCLEAN, L. Evidence for negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** v.64, p. 487-490, 2005.

REICHE, E. M.; BONAMETTI, A. M.; VOLTARELLI, J. C.; MORIMOTO, H. K.; WATANABE, M. A. Genetic polymorphisms in the chemokine and chemokine receptors: impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1). **Curr Med Chem** v.14, n.12, p. 1325-1334, 2007.

REICHE, E. M.; EHARA WATANABE, M. A.; BONAMETTI, A. M.; MORIMOTO, H. K.; AKIRA MORIMOTO, A.; WIECHMANN, S. L.; MATSUO, T.; CARVALHO DE OLIVEIRA, J.; VISSOCI REICHE, F. Frequency of CCR5-Delta32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of southern Brazilian population. **Int J Mol Med** v.22, p. 699-675, 2008.

SALVARANI, C.; BOIARDI, L.; TIMMS, J. M.; SILVESTRI, T.; RANZI, A.; MACCHIONI, P. L.; PULSATELLI, L.; DI GIOVINE, F. S.; Absence of the association with CC chemokine receptor 5 polymorphism in polymyalgia rheumatica. **Clin Exp Rheumatol** v.18, p. 591-595, 2000.

SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B. J.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.; FARBER, C. M.; SARAGOSTI, S.; LAPOUMEROUILLIE, C.; COGNAUX, J.; FORCEILLE, C.; MUYLDERMANS, G.; VERHOFSTEDDE, C.; BURTONBOY, G.; GEORGES, M.; IMAI, T.; RANA, S.; YI, Y.; SMYTH, R. J.; COLLMAN, R. G.; DOMS, R. W.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature** v.382, n.6593, p. 722-724, 1996.

SANDFORD, A. J.; ZHU, S.; BAI, T. R.; FITZGERALD, J. M.; PARE, P. D. The role of the C-C chemokine receptor 5 delta 32 polymorphism in asthma and in the production of regulated on activation, normal T cells expressed and secreted. **J Allergy Clin Immunol** v.108, p. 69-73, 2001.

SCHAUREN, J. S.; MARASCA, J. A.; VEIT, T. D.; MONTICIELO, O. A.; XAVIER, R. M.; BRENOL, J. C. T.; CHIES, J. A. B. et al. CCR5delta32 in systemic lupus

erythematosus: implications for disease susceptibility and outcome in a Brazilian population. **Lupus** v.22, n.802, 2013.

SCHEIBEL, I.; VEIT, T.; NEVES, A. G.; SOUZA, L.; PREZZI, S.; MACHADO, S.; KOHEM, C.; ICARELLI, M.; XAVIER, R.; BRENOL, J. C.; CHIES, J. A. Differential CCR5 Delta32 allelic frequencies in juvenile idiopathic arthritis subtypes: evidence for different regulatory roles of CCR5 in rheumatological diseases. **Scand J Rheumatol** v.37, p. 13-17, 2008.

SMITH, M. W.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; LOMB, D.; DEAN, M.; HUTTLEY, G.; O'BRIEN, S. J. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. **Nature Med** v.3, p. 1052-1053, 1997.

SUAREZ-KURTZ, G.; PENA, S. D. J.; STRUCHINER, C.J.; HUTZ, M.H. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. **Front Pharmacol** v.3, 2012.

TSAO, B. P. An update on genetic studies of systemic lupus erythematosus. **Curr Rheumatol Rep** v.4, n.4, p. 359-367, 2002.

TURNER, J. E.; PAUST, H. J.; STEINMETZ, O. M.; PETERS, A.; MEYER-SCHWESINGER, C.; HEYMANN, F.; HELMCHEN, U.; FEHR, S.; HORUK, R.; WENZEL, U.; KURTS, C.; MITTRÜCKER, H. W.; STAHL, R. A. K.; PANZER, U. CCR5 deficiency aggravates crescentic glomerulonephritis in mice. **J Immunol**, v.181, n.9, 2008.

TURNER, J. E.; PAUST, H. J.; BENNSTEIN, S. B.; BRAMKE, P.; KREBS, C.; STEINMETZ, O. M.; VELDEN, J.; HAAG, F.; STAHL, R. A.; PANZER, U. et al.

Protective role of CCR5 in murine lupus nephritis. **Am J Physiol Renal Physiol** v.302, n.11, 2012.

TVEITA, A.; REKVIG, O. P.; ZYKOVA, S. N. Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lupus nephritis. **Arthritis Res Ther** v.10, n.6, 2008.

VARGAS, A. E.; DA SILVA, M. A.; SILLA, L.; CHIES, J. A. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. **Tissue Antigens** v.66, p. 683-690, 2005.

VYSE, T. J.; KOTZIN, B. L. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Annu Rev Immunol** v.16, p. 261-292, 1998.

WAKELAND, E.K.; LIU, K.; GRAHAM, R.; BEHRENS, T. W. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Immunity** v.15, p. 397-408, 2001.

WANG, F. S.; HONG, W. G.; CAO, Y.; LIU, M. X.; JIN, L.; HU, L. P. et al. Population survey of CCR5 delta32, CCR5m303, CCR2b 64I, and SDF1 3'A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups. **J Acquir Immune Defic Syndr** v.32, n.124, 2003.

YAMADA, M.; YAGITA, H.; INOUE, H.; TAKANASHI, T.; MATSUDA, H.; MUNECHIKA, E.; KANAMARU, Y.; SHIRATO, I.; TOMINO, Y.; MATUSHIMA, K.; OKUMURA, K.; HASHIMOTO, H. et al. Selective accumulation of CCR4 T lymphocytes into renal tissue of patients with lupus nephritis. **Arthritis Rheum** v.46, n.3, p. 735-740, 2002.

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou as seguintes conclusões:

- Não se observaram diferenças entre as variáveis avaliadas nos grupos de pacientes com LES de etnia Caucasiana e não Caucasiana. De modo geral, as pacientes apresentaram uma mediana (IQR) de idade de início da doença de 30 (19,0 – 39,0) anos; uma duração mediana da doença de 10 (4,0 – 15,0) anos; baixa atividade da doença, com valores de SLEDAI  $\leq 3$ , C3  $\geq 90$  mg/dL, C4  $\geq 10$  mg/dL, anticorpos autoimunes (FAN)  $\geq 1:160$  e anti-dsDNA  $\geq 1:10$ . De acordo com a terapia, as pacientes Caucasianas e não Caucasianas não diferiram, e as frequências das características clínicas e laboratoriais também não diferiram entre os grupos de pacientes.
- As distribuições do genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta$ 32* e do alelo *CCR5 $\Delta$ 32* foram de 15,8% e 0,752 (7,5%), respectivamente, nas pacientes com LES; 19% e 0,0949 (9,4%) em pacientes Caucasianas, respectivamente; No grupo controle, as distribuições do genótipo *CCR5/CCR5 $\Delta$ 32* e do alelo *CCR5 $\Delta$ 32* foram de 3,8% e 0,190 (1,9%), respectivamente; 4% e 0,0202 (2,0%), respectivamente, em Caucasianas livres de doença;
- As frequências observadas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e apresentaram uma forte associação com a presença da doença nas pacientes em geral, com OR de 4,47 (IC de 95%: 1,72-13,24) para as portadoras do genótipo em heterozigose *CCR5/CCR5 $\Delta$ 32* e OR de 4,45 (IC de 95%: 1,65-12,50) para as portadoras do alelo *CCR5 $\Delta$ 32*. As frequências observadas também apresentaram uma forte associação com a presença da doença nas pacientes Caucasianas, com OR de 5,56 (IC de 95%: 1,76-17,54) para as portadoras do genótipo em heterozigose *CCR5/CCR5 $\Delta$ 32* e OR de 5,09 (IC de 95%: 1,65-15,66);

- As pacientes em geral e Caucasianas portadoras do genótipo *CCR5/CCR5Δ32* apresentaram a doença com menor idade, maior frequência do padrão nuclear homogêneo, positividade aos anticorpos anti-dsDNA e maior nível de leucocitose quando comparadas às portadoras do genótipo *CCR5/CCR5*.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes resultados sugerem que em mulheres Caucasianas da população brasileira, o genótipo *CCR5/CCR5Δ32* pode ser considerado um marcador de susceptibilidade ao desenvolvimento do LES e de uma evolução clínica mais grave, com possibilidade de envolvimento renal, tendo em vista sua associação com anticorpos anti-dsDNA, considerado como um importante fator da resposta autoimune humoral na patogênese da NF. Considerando que o LES é uma doença complexa e poligênica, estudos com maior número de pacientes e avaliação de outros polimorfismos genéticos localizados na mesma região do *CCR5*, uma vez que esta região apresenta forte associação com o desenvolvimento da doença, podem reproduzir e assim confirmar os resultados obtidos no presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR F.; NÚÑES-ROLDÁN, A.; TORRES, B.; WICHMANN, I.; SÁNCHEZ-ROMÁN, J.; GONZÁLES-ESCRIBANO, M. F. et al., Chemokine Receptor CCR2/CCR5 Polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol** v.30, n.8, p. 1770-1774, 2003.
- AHMADABADI, B. N.; HASSANSHAHI, G.; KHORAMDELAZAD, H.; MIRZAEI, V.; SAJADI, S. M.; HAJGHANI, M.; KHODADADI, H.; POURALI, R.; ARABABADI, M. K.; KENNEDY, D. Down-regulation of CCR5 expression on the peripheral blood CD8<sup>+</sup> T cells of South-Eastern Iranian patients with chronic hepatitis B infection. **Inflammation** v.36, p. 136-140, 2013.
- AL-ABDULHADI, S. A.; AL-RABIA, M. W. Linkage and haplotype analysis for chemokine receptors clustered on chromosome 3p.21.3 and transmitted in family pedigrees with asthma and atopy. **Ann Saudi Med** v.30, p. 115-122, 2010.
- ALARCÓN-SEGOVIA, D. ALARCÓN-RIQUELME, M. E.; CARDIEL, M. H.; CAEIRO, F.; MASSARDO, L.; VILLA, A. R.; PONS-ESTEL, B. A. et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. **Arthritis Rheum** v.52, n.4, p.1138-1147, 2005.
- ALARCÓN, G. S.; MCGWIN, G.; Jr PETRI, M.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; FESSLER, B. J.; VILÁ, L. M.; EDBERG, J. C.; REVEILLE, J. D.; KIMBERLY, R. P. et al. Time to renal disease and end-stage renal disease in PROFILE: a multiethnic lupus cohort. **PLoS Med** v.3, n.10, e396, 2006.
- AMOURA, Z.; COMBADIÈRE, C.; FAURE, S.; PARIZOT, C.; MIYARA, M.; RAPHAËL, D.; GHILLANI, P.; DEBRE, P.; PIETTE, J. C.; GOROCHOV, G. et al. Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. **Arthritis Rheum** v.48, n.12, p. 3487-3496, 2003.
- ARNETT, F. C.; REVEILLE, J. D.; WILSON, W. Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis, **Semin Arthritis Rheum** v. 14, n. 1, p. 24–35, 1984.
- AUPHAN, N.; DIDONATO, J. A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A.; KARIN, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. **Science** v.13, n.270, p. 286-290, 1995.
- BALLESTAR, E.; ESTELLER, M.; RICHARDSON, B. C. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. **J Immunol** v.176, p. 7143-7147, 2006.
- BERNATSKY, S.; BOIVIN, J. F.; JOSEPH, L.; MANZI, S.; GINZLER, E.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M.; FORTIN, P. R.; PETRI, M.; BARR, S.; GORDON, C.; BAE, S. C.; ISENBERG, D.; ZOMA, A.; ARANOW, C.; DOOLEY, M. A.; NIVED, O.; STURFELT, G.; STEINSSON, K.; ALARCÓN, G.; SENÉCAL, J. L.; ZUMMER, M.; HANLY, J.; ENSWORTH, S.; POPE, J.; EDWORTHY, S.; RAHMAN, A.; SIBLEY, J.; EL-GABALAWY, H.; MCCARTHY, T.; ST PIERRE, Y.; CLARKE, A.; RAMSEY-

- GOLDMAN, R. Mortality in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.54, p. 2550-2557, 2006.
- BERNIER, M. O.; MIKAELOFF, Y.; HUDSON, M.; SUISSA, S. Combined oral contraceptive use and risk of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.61, n.4, p. 476-48, 2009.
- BISSET, L. R.; SCHMID-GRENDELMEIER, P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. **Curr Opin Pulm Med** v.11, p. 35-42, 2005.
- BLANPAIN, C.; DORANZ, B. J.; BONDUE, A.; GOVAERTS, C.; De LEENER, A.; VASSART, G.; DOMS, R. W.; PROUDFOOT, A.; PARMENTIER, M. The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle. **J Biol Chem** v.278, n.7 p. 5179-5187, 2003.
- BLOCK, S. R.; WINFIELD, J. B.; LOCKSHIN, M. D.; D'ANGELO, W. A.; CHRISTIAN, C. L. et al. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets **Am J Med**, v.59, n. 4, p. 533–552, 1975.
- BOMBADIER, C.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M. B.; CARON, D.; CHANG, C. H. et al. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index of lupus patients. The Committee on prognosis studies in SLE. **Arthritis Rheum** v.35, p.630-640, 1992.
- BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; SHOENFELD, Y.; GERSHWIN, M. E. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Rev** v.3, n.6, p. 423-453, 2004.
- BOTTINI, N.; MUSUMECI, L.; ALONSO, A.; RAHMOUNI, S.; NIKA, K.; ROSTAMKHANI, M.; MACMURRAY, J.; MELONI, G. F.; LUCARELLI, P.; PELLECCIA, M.; EISENBARTH, G. S.; COMINGS, D.; MUSTELIN, T. et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nat Genet** v.36, p. 337–338, 2004.
- BREDIUS, R. G.; de VRIES, C. E.; TROELSTRA, A.; van ALPHEN, L.; WEENING, R. S.; van de WINKEL, J. G.; OUT, T. A. et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Hemophilus influenzae* type B opsonized with polyclonal human IgG1 and IgG2 antibodies. Functional hFcy RIIa polymorphism to IgG2. **J Immunol** v.151, p. 1463–1472, 1993.
- CARVALHO, C.; CALVISI, S. L.; LEAL, B.; BETTENCOURT, A.; MARINHO, A.; ALMEIDA, I.; FARINHA, F.; COSTA, P. P.; SILVA, B. M.; VASCONCELOS, C. et al. CCR5-Delta32: implications in SLE development. **Int J Immunogenet** v.0, p. 1-6, 2013.
- CHAKRAVARTY, E. F.; BUSH, T. M.; MANZI, S.; CLARKE, A. E.; WARD, M. M. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. **Arthritis Rheum** v.56, p. 2092-2094, 2007.

- CHAN, R. W.; LAI, F. M.; LI, E. K.; TAM, L. S.; WONG, T. Y.; SZETO, C. Y.; LI, P. K.; SZETO, C. C. Expression of chemokine and fibrosing factor messenger RNA in the urinary sediment of patients with lupus nephritis. **Arthritis Rheum** v.50, n.9, 2004.
- CHEN, J. Y.; WANG, C. M.; TSAO, K. C.; CHOW, Y. H.; WU, J. M.; LI, C. L.; HO, H. H.; WU, Y. J.; LUO, S. F. et al. Fcγ receptor IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms of systemic lupus erythematosus in Taiwan. **Ann Rheum Dis** v.63, p. 877–880, 2004.
- CHONG, W. P.; IP, W. K.; WONG, W. H.; LAU, C. S.; CHAN, T. M.; LAU, Y. L. et al. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. **Genes Immun** v.5, p. 484–492, 2004.
- COHEN, S.; DADI, H.; SHAOUL, E.; SHARFE, N.; ROIFMAN, C. M. et al. Cloning and characterization of a lymphoid specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, **Lyp Blood** v.93, p. 2013–2024, 1999.
- COHEN-SOLAL, J. F.; JEGANATHAN, V.; HILL, L.; KAWABATA D.; RODRIGUEZ-PINTO, D.; GRIMALDI, C.; DIAMOND, B. et al. Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. **Lupus** v.17, v.6, p. 528–532, 2008.
- COSTENBADER K, FESKANICH D, STAMPFER M, KARLSON E et al. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. **Arthritis Rheum** v.56, p. 1251–1262, 2007.
- COSTENBADER K H, KIM D J, PEERZADA J, LOCKMAN S, NOBLES-KNIGHT D, PETRI M, KARLSON E W et al., Cigarette smoking and risk of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.5, n.3, p. 849-857, 2004.
- CRISPÍN J C, LIOSSIS S N C, KIS-TOTH K, LIEBERMAN L A, KYTTARIS V C, JUANG Y T, TSOKOS G C. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. **Trends Mol Med**. v.16, n.2, p. 47-57, 2010.
- DAVIS, G. S.; HOLMES, C. E.; PFEIFFER, L. M.; HEMENWAY, D. R. Lymphocytes, lymphokines, and silicosis. **J Environ Pathol Toxicol Oncol** v.20, s.1, p. 53-65, 2001.
- DEAPEN, D.; ESCALANTE, A.; WEINRIB, L.; HORWITZ, D.; BACHMAN, B.; ROY-BURMAN, P.; WALKER, A.; MACK, T. M. et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.35, n.3 p. 311-318, 1992.
- DELLAVANCE, A.; JR GABRIEL, A.; NUCCITELLI, B.; TALIBERTI, B. H.; VON MÜHLEN, C. A.; BICHARA, C. D. A.; DOS SANTOS, C. H. R.; BUENO, C.; YANO, C. M.; MANGUEIRA, C. L. P.; CARVALHO, D. G.; CARDOSO, E.; BONFÁ, E.; IKEDA E ARAÚJO, F.; RASSI, G. G.; MUNDIM, H. M.; BENDET, I.; REGO, J.; VIEIRA, L. M. E. A.; ANDRADE, L. E. C.; BARBOSA, M. O. F.; SUGIYAMA, M.; SANTIAGO, M. B.; SLHESSARENKO, N.; DA SILVA, N. A.; FRANCESCANTONIO, P. L. C.; JARACH, R.; SUDA, R.; LEVY, R. A.; SAMPAIO, S. O.; NEVES, S. P. F.; CRUVINEL, W. M.; DOS SANTOS, W. S.; NÓBREGA, Y. K. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. **Rev Bras Reumatol** v.49, n.2, p. 89-109, 2009.

DEMIRCI, F. Y.; MANZI, S.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; MINSTER, R. L.; KENNEY, M.; SHAW, P. S.; DUNLOP-THOMAS, C. M.; KAO, A. H.; RHEW, E.; BONTEMPO, F.; KAMMERER, C.; KAMBOH M. I. et al. Association of a common interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) variant with increased risk of systemic lupus erythematosus (SLE). **Ann Hum Genet** v.71, p. 308–311, 2007.

DENG, Y.; TSAO, B. P. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. **Nat Rev Rheumatol** v.6, n.12, p. 683-692, 2010.

DEVI, L. B.; BHATNAGAR, A.; WANCHU, A.; SHARMA, A.A study on the association of autoantibodies, chemokines and its receptor with disease activity in systemic lupus erythematosus in North Indian population. **Rheumatol Int** v.33, p.2819-2826, 2013.

DE VOUX, A.; CHAN, M. C.; FOLEFOC, A. T.; MADZIVA, M. T.; FLANAGAN, C. A. Constitutively active CCR5 chemokine receptors differ in mediating HIV envelope-dependent fusion. **PLoS One** v.8, n.1, 2013.

DOIRA, A.; BRIANI, C. Lupus: improving long-term prognosis. **Lupus** v.17, n.3, p.166-170, 2008.

DOHERTY, D. G.; IRELAND, R.; DEMAINE, A. G.; WANG, F.; VEERAPAN, K.; WELSH, K. I.; VERGANI, D. Major histocompatibility complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus in southern Chinese. **Arthritis Rheum** v.35, n.6, p. 641-646, 1992

DORIA, A.; IACCARINO, L.; GHIRARDELLO, A. Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus. **Am J Med** v.119, p.1497-1499, 2006.

DRABORG, A. H.; DUUS, K.; HOUEN, G. Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. **Clin Dev Immunol**, 2013.

DUIJS, A. J.; BOOTSMA, H.; DERKSEN, R. H.; SPRONK, P. E.; KATER, L.; KALLENBERG, C. G.; CAPEL, P. J.; WESTERDAAL, N. A.; SPIERENBURG, G. T.; GMELIG-MEYLING, F. H. et al. Skewed distribution of IgG Fcγ receptor IIa (*CD32*) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. **Arthritis Rheum** v.38, p. 1832– 1836, 1995.

ERIKSSON, C.; ENESLÄTT, K.; IVANOFF, J.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S.; SUNDQVIST, K-G. Abnormal expression of chemokine receptors on T-cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus** v.12, p. 766-775, 2003.

ESKDALE, J.; WORDSWORTH, P.; BOWMAN, S.; FIELD, M.; GALLAGHER, G. et al. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens** v.49, p. 635–639, 1997.

ESKDALE, J.; GALLAGHER, G.; VERWEIJ, C. L.; KEIJSERS, V.; WESTENDORP, R. G.; HUIZINGA, T. W. et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proc Natl Acad Sci USA** v.95, p. 9465–9470, 1998.

FERNANDO, M. M.; STEVENS, C. R.; SABETI, P. C.; WALSH, E. C.; MCWHINNIE, A. J.; SHAH, A.; GREEN, T.; RIOUX, J. D.; VYSE, T. J. et al. Identification of two

independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families. **PLoS Genet** v.3, n.11, 2007.

FINCKH, A.; COOPER, G. S.; CHIBNIK, L. B.; COSTENBADER, K. H.; WATTS, J.; PANKEY, H.; FRASER, P. A.; KARLSON, E. W. Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. **Arthritis Rheum**, v.54, n.11, p. 3648-3654, 2006.

FRITZLER, M. J; ELKON, K. B. Rheumatology. In: **Autoantibodies in SLE**. Philadelphia, USA, Elsevier, 2003.

GARCÍA-CARRASCO, M.; PINTO, C.M.; POLANO, I.E.; CERVERA, R., ANAYA J-M. Systemic lupus erythematosus. In: ANAYA, J-M.; SHOELFELD, Y.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; LEVY, R.A.; CERVERA, R. (eds). **Autoimmunity: from bench to bedside**. Bogota: El Rosario University Press, School of Medicine and Health Sciences CREA, p. 427-441), 2013.

GATEVA, V.; SANDLING, J. K.; HOM, G.; TAYLOR K. E.; CHUNG, S. A.; SUN, X.; ORTMANN, W.; KOSOY, R.; FERREIRA, R. C.; NORDMARK, G.; GUNNARSSON, I.; SVENUNGSSON, E.; PADYUKOV, L.; STURFELT, G.; JÖNSEN, A.; BENGTSSON, A. A.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S.; BAECHLER, E. C.; BROWN, E. E.; ALARCÓN, G. S.; EDBERG, J. C.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; MCGWIN, G.; REVEILLE Jr, J. D.; VILÁ, L. M.; KIMBERLY, R. P.; MANZI, S.; PETRI, M. A.; LEE, A.; GREGERSEN, P. K.; SELDIN, M. F.; RÖNNBLUM, L.; CRISWELL, L. A.; SYVÄNEN, A. C.; BEHRENS, T. W.; GRAHAM, R. et al. A large-scale replication study identifies *TNIP1*, *PRDM1*, *JAZF1*, *UHRF1BP1* and *IL10* as risk loci for systemic lupus erythematosus. **Nat Genet** v.41 p. 1228–1233, 2009.

GHORBAN, K.; DADMANESH, M.; HASSANSHAHI, G.; MOMENI, M.; ZARE-BIDAKI, M.; ARABABADI, M. K.; KENNEDY, D. Is the CCR5  $\Delta$  32 mutation associated with immune system-related diseases? **Inflammation** v.36, n.3 p. 633-642, 2013.

GILES, I.; ISENBERG, D. Lupus in the family—analysis of a cohort followed from 1978 to 1999 **Lupus** v.10, n.1, p.38–44, 2001.

GOLDBERG, M. A.; ARNETT, F. C.; BIAS, W. B.; SHULMAN, L. E. Histocompatibility antigens in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.19, p. 129-132, 1976.

GRAMMATIKOS, A. P.; TSOKOS, G. C. Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. **Trends Mol Med** v.18, n.2, p. 101-108, 2012.

GRAHAM, R. R.; ORTMANN, W. A.; LANGEFELD, C. D.; JAWAHEER, D.; SELBY, S. A.; RODINE, P. R.; BAECHLER, E. C.; ROHLF, K. E.; SHARK, K. B.; ESPE, K. J.; GREEN, L. E.; NAIR, R. P.; STUART, P. E.; ELDER, J. T.; KING, R. A.; MOSER, K. L.; GAFFNEY, P. M.; BUGAWAN, T. L.; ERLICH, H. A.; RICH, S. S.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. **Am J Hum Genet**; v.71, n.3, p. 543–553, 2002.

GRAHAM, R. R.; KOZYREV, S. V.; BAECHLER, E. C.; REDDY, M. V.; PLENGE, R. M.; BAUER, J. W.; ORTMANN, W. A.; KOEUTH, T.; GONZÁLEZ-ESCRIBANO, M. F.; PONS-ESTEL, B.; PETRI, M.; DALY, M.; GREGERSEN, P. K.; MARTÍN, J.; ALTSHULER, D.; BEHRENS, T. W.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. **Nat Genet** v.38, p. 550–555, 2006.

GRAHAM, R. R.; KYOGOKU, C.; SIGURDSSON, S.; VLASOVA, I. A.; DAVIES, L. R.; BAECHLER, E. C.; PLENGE, R. M.; KOEUTH, T.; ORTMANN, W. A.; HOM, G.; BAUER, J. W.; GILLET, C.; BURTT, N.; CUNNINGHAME G. D. S.; ONOFRIO, R.; PETRI, M.; GUNNARSSON, I.; SVENUNGSSON, E.; RÖNNBLUM, L.; NORDMARK, G.; GREGERSEN, P. K.; MOSER, K.; GAFFNEY, P. M.; CRISWELL, L. A.; VYSE, T. J.; SYVÄNEN, A. C.; BOHJANEN, P. R.; DALY, M. J.; BEHRENS, T. W.; ALTSHULER, D. et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (*IRF5*) define risk and protective haplotypes for human lupus. **Proc Natl Acad Sci USA** v.104, p. 6758–6763, 2007.

GRAHAM, R. R.; COTSAPAS, C.; DAVIES, L.; HACKETT, R.; LESSARD, C. J.; LEON, J. M.; BURTT, N. P.; GUIDUCCI, C.; PARKIN, M.; GATES, C.; PLENGE, R. M.; BEHRENS, T. W.; WITHER, J. E.; RIOUX, J. D.; FORTIN, P. R.; GRAHAM, D. C.; WONG, A. K.; VYSE, T. J.; DALY, M. J.; ALTSHULER, D.; MOSER, K. L.; GAFFNEY, P. M. et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. **Nat Genet** v.40, p. 1059–1061, 2008.

GREGERSEN, P. K. Discordance for autoimmunity in monozygotic twins. Are “identical” twins really identical? **Arthritis Rheum** v.36, p. 1185–1192, 1993.

GREGERSEN, P. K.; OLSSON, L. M. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. **Annu Rev Immunol** v.27, p. 363–391, 2009.

GROSS, A. J.; HOCHBERG, D.; RAND, W. M.; THORLEY-LAWSON, D. A. EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. **J Immunol** v. 174, n.11, p. 6599–6607, 2005.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e seus receptores – características e funções fisiológicas. **Acta Med Port** v.24 p. 967-976, 2011.

HAN, J.W.; ZHENG, H. F.; CUI, Y.; SUN, L. D.; YE, D. Q.; HU, Z.; XU, J. H.; CAI, Z. M.; HUANG, W.; ZHAO, G. P.; XIE, H. F.; FANG, H.; LU, Q. J.; XU, J. H.; LI, X. P.; PAN, Y. F.; DENG, D. Q.; ZENG, F. Q.; YE, Z. Z.; ZHANG, X. Y.; WANG, Q. W.; HAO, F.; MA, L.; ZUO, X. B.; ZHOU, F. S.; DU, W. H.; CHENG, Y. L.; YANG, J. Q.; SHEN, S. K.; LI, J.; SHENG, Y. J.; ZUO, X. X.; ZHU, W. F.; GAO, F.; ZHANG, P. L.; GUO, Q., LI, B.; GAO, M.; XIAO, F. L.; QUAN, C.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; ZHU, K. J.; LI, Y.; HU, D. Y.; LU, W. S.; HUANG, J. L.; LIU, S. X.; LI, H.; REN, Y. Q.; WANG, Z. X.; YANG, C. J.; WANG, P. G.; ZHOU, W. M.; LV, Y. M.; ZHANG, A. P.; ZHANG, S. Q.; LIN, D.; LI, Y.; LOW, H. Q.; SHEN, M.; ZHAI, Z. F.; WANG, Y.; ZHANG, F. Y.; YANG, S.; LIU, J. J.; ZHANG, X. J. et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. **Nat Genet** v.41, p. 1234–1237, 2009a.

HAN, S.; KIM-HOWARD, X.; DESHMUKH, H.; KAMATANI, Y.; VISWANATHAN, P.; GUTHRIDGE, J. M.; THOMAS, K.; KAUFMAN, K. M.; OJWANG, J.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; BACA, V.; OROZCO, L.; RHODES, B.; CHOI, C. B.; GREGERSEN, P. K.; MERRILL, J. T.; JAMES, J. A.; GAFFNEY, P. M.; MOSER, K. L.; JACOB, C. O.; KIMBERLY, R. P.; HARLEY, J. B.; BAE, S. C.; ANAYA, J. M.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E.; MATSUDA, K.; VYSE, T. J.; NATH, S. K. et al. Evaluation of imputation-based association in and around the integrin- $\alpha$ M (*ITGAM*) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within *ITGAM* and systemic lupus erythematosus (SLE). **Hum Mol Genet** v.18, p. 1171–1180, 2009b.

HARLEY, J. B.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E.; CRISWELL, L. A.; JACOB, C. O.; KIMBERLY, R. P.; MOSER, K. L.; TSAO, B. P.; VYSE, T. J.; LANGEFELD, C. D.; NATH, S. K.; GUTHRIDGE, J. M.; COBB, B. L.; MIREL, D. B.; MARION, M. C.; WILLIAMS, A. H.; DIVERS, J.; WANG, W.; FRANK, S. G.; NAMJOU, B.; GABRIEL S. B.; LEE, A. T.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W.; TAYLOR, K. E.; FERNANDO, M.; ZIDOVETZKI, R.; GAFFNEY, P. M.; EDBERG, J. C.; RIOUX, J. D.; OJWANG, J. O.; JAMES J. A.; MERRILL, J. T.; GILKESON, G. S.; SELDIN, M. F.; YIN, H.; BAECHLER, E. C.; LI, Q. Z.; WAKELAND, E. K.; BRUNER, G. R.; KAUFMAN, K. M.; KELLY J. A. et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in *ITGAM*, *PXK*, *KIAA1542* and other loci. **Nat Genet** v.40, p. 204–210, 2008.

HERFARTH, H.; POLLOK-KOPP, B.; GOKE, M.; PRESS, A.; OPPERMAN, M. Polymorphism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Chron's disease. **Immunol Lett** v.77, p. 113-117, 2001.

HOCHBERG, M. C. The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol** v.14, p. 867–869, 1987.

HOCHBERG M. C., et al. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.40, p.1725, 1997.

HOM, G.; GRAHAM, R. R.; MODREK, B.; TAYLOR, K. E.; ORTMANN, W.; GARNIER, S.; LEE, A. T.; CHUNG, S. A.; FERREIRA, R. C.; PANT, P. V.; BALLINGER, D. G.; KOSOY, R.; DEMIRCI, F. Y.; KAMBOH, M. I.; KAO, A. H.; TIAN, C.; GUNNARSSON, I.; BENGTSSON, A. A.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S.; PETRI, M.; MANZI, S.; SELDIN, M. F.; RÖNNBLUM, L.; SYVÄNEN, A. C.; CRISWELL, L. A.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. et al. Association of systemic lupus erythematosus with *C8orf13-BLK* and *ITGAM-ITGAX*. **N Engl J Med** v.358, p. 900–909, 2008.

HONG, G. H.; KIM, H. Y.; TAKEUCHI, F.; NAKANO, K.; YAMADA, H.; MATSUTA, K.; HAN, H.; TOKUNAGA, K.; ITO, K.; PARK, K. S. Association of complement C4 and HLA-DR alleles with systemic lupus erythematosus in Koreans. **J Rheumatol** v.21, n.3, p. 442-447, 1994

HUGHES, G. C. Progesterone and Autoimmune Disease. **Autoimmun Rev** n.11, p. 6-7, 2012.

IMAI, T.; NAGIRA, M.; TAKAGI, S.; KAKIZAKI, M.; NISHIMURA, M.; , WANG, J.; GRAY, P. W.; MATSUSHIMA, K.; YOSHIE, O. et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. **Int Immunol** v.11, n.1, p. 81-88, 1999.

KAIMEN-MACIEL, D. R.; REICHE, E. M. V.; SOUZA, D. G. B.; COMINI, E. R. F.; BOBROFF, F.; MORIMOTO, H. K.; WATANABE, M. A. E.; OLIVEIRA, J. C. O.; MATSUO, T.; LOPES, J.; DONADI, E. A. et al. CCR5-Δ32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis. **Int J Mol Med** v.20, p. 337-344, 2007.

KAMEN, D. L. How can we reduce the risk of serious infections for patients with systemic lupus erythematosus? **Arthritis Res Ther** v.11, n.5, 2009.

KANG, I.; QUAN, T.; NOLASCO, H.; PARK, S. H.; HONG, M. S.; CROUCH, J.; PAMER, E. G.; HOWE, J. G.; CRAFT J. Defective control of Epstein-Barr virus infection in systemic lupus erythematosus. **J Immunol** v. 172, n. 2, 2004.

KASITANON, N.; MAGDER, L. S.; PETRI, M. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. **Medicine (Baltimore)** v.85, p. 147-156, 2006.

KAWASAKI, A.; ITO, I.; HIKAMI, K.; OHASHI, J.; HAYASHI, T.; GOTO, D.; MATSUMOTO, I.; ITO, S.; TSUTSUMI, A.; KOGA, M.; ARINAMI, T.; GRAHAM, R. R.; HOM, G.; TAKASAKI, Y.; HASHIMOTO, H.; BEHRENS, T. W.; SUMIDA,.; TSUCHIYA, N. et al. Role of *STAT4* polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the *STAT1-STAT4* region. **Arthritis Res Ther** v.10, n.5, r113, 2008a.

KAWASAKI, A.; KYOGOKU, C.; OHASHI, J.; MIYASHITA, R.; HIKAMI, K.; KUSAOI, M.; TOKUNAGA, K.; TAKASAKI, Y.; HASHIMOTO, H.; BEHRENS, T. W.; TSUCHIYA, N. et al. Association of *IRF5* polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: support for a crucial role of intron 1 polymorphisms. **Arthritis Rheum** v.58, p. 826–834, 2008b.

KELLY, J. A.; KELLEY, J. M.; KAUFMAN, K. M.; KILPATRICK, J.; BRUNER, G. R.; MERRILL, J. T.; JAMES, J. A.; FRANK, S. G.; REAMS, E.; BROWN, E. E.; GIBSON, A. W.; MARION, M. C.; LANGEFELD, C. D.; LI, Q. Z.; KARP, D. R.; WAKELAND, E. K.; PETRI, M.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; REVEILLE, J. D.; VILÁ, L. M.; ALARCÓN, G. S.; KIMBERLY, R. P.; HARLEY, J. B.; EDBERG, J. C. et al. Interferon regulatory factor-5 is genetically associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. **Genes Immun** v.9, p. 187–194, 2008.

KOENE, H. R.; KLEIJER, M.; SWAAK, A. J.; SULLIVAN, K. E.; BIJL, M.; PETRI, M. A.; KALLENBERG, C. G.; ROOS, D.; von dem BORNE, A. E.; de HAAS, M. et al. The FcγRIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.41, p. 1813–1818, 1998a.

KOENE, H. R.; KLEIJER, M.; ROOS, D.; de HASSE, M.; von dem BORNE, A. E. et al. FcγRIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct FcγRIIIB genes in NA (1<sup>+</sup>,2<sup>+</sup>) SH (+) individuals. **Blood** v.91, p. 673–679, 1998b.

KOHEM, C. L.; BRENOL, J. C.; XAVIER, R. M.; BREDEMEIER, M.; BRENOL, C. V.; DEDAVID, E.; SILVA, T. L.; DE CASTILHOS MELLO, A.; CAÑEDO, A. D.; NEVES, A. G.; CHIES, J. A. The chemokine receptor CCR5 genetic polymorphism and expression in rheumatoid arthritis patients. **Scand J Rheumatol** v.36, p. 359-364, 2007.

KOZYREV, S. V.; ABELSON, A. K.; WOJCIK, J.; ZAGHLOOL, A.; LINGA, R. M. V.; SANCHEZ, E.; GUNNARSSON, I.; SVENUNGSSON, E.; STURFELT, G.; JÖNSEN, A.; TRUEDSSON, L.; PONS-ESTEL, B. A.; WITTE, T.; D'ALFONSO, S.; BARIZZONE, N.; DANIELI, M. G.; GUTIERREZ, C.; SUAREZ, A.; JUNKER, P.; LAUSTRUP, H.; GONZÁLEZ-ESCRIBANO, M. F.; MARTIN, J.; ABDERRAHIM, H.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. et al. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. **Nat Genet** v.40, p. 211–216, 2008.

KYOGOKU, C.; DIJSTELBLOEM, H. M.; TSUCHIYA, N.; HATTA, Y.; KATO, H.; YAMAGUCHI, A.; FUKAZAWA, T.; JANSEN, M. D.; HASHIMOTO, H.; van de WINKEL, J. G.; KALLENBERG, C. G.; TOKUNAGA, K. et al. Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of *FCGR2B* to genetic susceptibility. **Arthritis Rheum** v.46 p. 1242–1254, 2002.

LEANDRO, M. J.; EDWARDS, J. C.; CAMBRIDGE, G.; EHERENSTEIN, M. R.; ISENBERG, D. A. Na open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.46, n.10, p. 2673-2677, 2002.

LEE, H. S.; CHUNG, Y. H.; KIM, T. G.; KIM, T. H.; JUN, J. B.; JUNG, S.; BAE, S. C.; YOO, D. H. Independent association of HLA-DR and FCγ receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatol (Oxford)** v.42, n.12, p. 1501-1507, 2003.

LEHNER, T. The role of CCR5 chemokine ligands and antibodies to CCR5 coreceptors in preventing HIV infection. **Trends Immunol** v.23, n.7, 2002

LEIGH, J.; WANG, H.; BONIN, A.; PETERS, M.; RUAN, X. Silica-induced apoptosis in alveolar and granulomatous cells in vivo. **Environ Health Perspect.** v.105, s.5, p. 1241-1245, 1997.

LEVY, D. M.; KAMPHUIS, S. Systemic lupus erythematosus in children and adolescents. **Pediatric Clin North Am** v.59, n.2, p. 345-364, 2012.

LINDNER, E.; NORDANG, G. B. N.; MELUN, E.; FLATØ, B.; SELVAAG, A. M.; THORSBY, E.; KVIEN, T. K. FØRRE, Ø. T.; LIE, B. A. Lack of association between the chemokine receptor 5 polymorphism CCR5delta32 in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis **BMC Medical Genetics** v.8, n.33, 2007.

LIT, L. C.; WONG, C. K.; TAM, L. S.; LI, E. K.; LAM, C. W. Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis** v.65, n.2, 2005.

LOETSCHER, P.; UGUCCIONI, M.; BORDOLI, L.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B.; CHIZZOLINI, C.; DAYER, J. M. et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes [letter]. **Nature** v.391, n.6665, p. 344-345, 1998.

LÖFGREN, S. E.; YIN, H.; DELGADO-VEGA, A. M.; SANCHEZ, E.; LEWÉN, S.; PONS-ESTEL, B. A.; WITTE, T.; D'ALFONSO, S.; ORTEGO-CENTENO, N.; MARTIN, J.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E.; KOZYREV S. V. et al. Promoter insertion/deletion in the IRF5 gene is highly associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in distinct populations, but exerts a modest effect on gene expression in peripheral blood mononuclear cells. **J Rheumatol** v.37, p. 574–578, 2010.

LOOD, C.; GULLSTRAND, B.; TRUEDSSON, L.; OLIN, A. I.; ALM, G. V.; RÖNNBLUM, L.; STURFELT, G.; ELORANTA, M. L.; BENGTSSON, A. A. et al. C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. **Arthritis Rheum** v.60, p. 3081–3090, 2009.

LU, J. J.; CHEN, D. Y.; HSIEH, C. W.; LAN, F. J.; LIN, S. H. Association of Epstein-Barr virus infection with systemic lupus erythematosus in Taiwan. **Lupus**, v.16, n.3, p. 168-175, 2007.

LUO, B. H.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. et al. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu Rev Immunol** v.25, p. 619–647, 2007.

MACK, M.; BRÜHL, H.; GRUBER, R.; JAEGER, C.; CIHAK, J.; EITER, V.; PLACHÝ, J.; STANGASSINGER, M.; UHLIG, K.; SCHATTKIRCHNER, M.; SCHLÖNDORFF, D. Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusion of patients with different forms of arthritis. **Arthritis Rheum** v.42, p. 981-988, 1999.

MACK, M.; CIHAK, J.; SIMONIS, C.; LUCKOW, B.; PROUDFOOT, A. E.; PLACHÝ, J.; BRÜHL, H.; FRINK, M.; ANDERS, H. J.; VIELHAUER, V.; PFIRSTINGER, J.; STANGASSINGER, M.; SCHLÖNDORFF, D. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. **J Immunol** v.166, n.7, p.4697-4704, 2001.

MAGIEROWSKA, M.; LEPAGE, V.; BOUBNOVA, L.; CARCASSI, C.; JUAN, D.; DJOULAH, S. et al. Distribution of the CCR5 gene 32 base pair deletion and SDF-3'A variant in healthy individuals from different populations. **Immunogenetics** v.48, n.417, 1998.

MAGNUSSON, V.; JOHANNESON, B.; LIMA, G.; ODEBERG, J.; ALARCÓN-SEGOVIA, D.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. et al. Both risk alleles for FcγRIIA and FcγRIIA are susceptibility factors for SLE:a unifying hypothesis. **Genes Immun** v.5, p. 130–137, 2004.

MAMTANI, M.; ROVIN, B.; BREY, R.; CAMARGO, J. F.; KULKARNI, H.; HERRERA, M.; CORREA, P.; HOLLIDAY, S.; ANAYA, J. M.; AHUJA, S. K. et al. CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis** v.67, n.8, p. 1076-1083, 2008.

MANSON, J. J.; RAHMAN, A. Systemic lupus erythematosus. **Orphanet J Rare Dis** v.1, p. 6, 2006.

- MANZI, M. S.; STARK E. V.; RAMSEY-GOLDMAN R. Rheumatology. In: **Epidemiology and classification of systemic lupus erythematosus**. Philadelphia, USA, Elsevier, 2003.
- MARTENS, H. A.; KALLENBERG, C. G.; BIJL, M. et al. Role of CCR5 Delta32 bp deletion in RA and SLE. **Autoimmunity** v.42, n.4, p. 260-262, 2009.
- MARTENS, H. A.; GROSS, S.; STEEGE, G.; BROUWER, E.; BERDEN, J. H. M.; SEVAUX, R.; DERKSEN, R. H. W. M.; VOSKUYL, A. E.; BERGER, S. P.; NAVIS, G. J.; KALLENBERG, C. G. M.; BIJL, M. Lack of association of C-C chemokine receptor 5  $\Delta$ 32 deletion status with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, and disease severity. **J Rheumatol** v.37, n.11, 2010.
- MEHRAN, R.; QUISMORIO, F. P. Jr; STRASSMANN, G.; STIMMLER, M. M.; HORWITZ, D. A.; KITRIDOU, R. C.; GAUDERMAN, W. J.; MORRISON, J.; BRAUTBAR, C.; JACOB, C. O. et al. Synergistic effect between *IL-10* and *bcl-2* genotypes in determining susceptibility to SLE. **Arthritis Rheum** v.41, p. 596–602, 1998.
- MIKAWA, A. Y.; TAGLIAVINI, S. A.; COSTA, P. I. CCR5 genotype and plasma  $\beta$ -chemokine concentration of Brazilian HIV-infected individuals. **Braz J Med Biol Res** v.35, p. 1333-1337, 2002.
- MORÁN, G.A.G.; PARRA-MEDINA, R.; CARDONA, A. G.; QUINTERO-RONDEROS, P.; RODRIGUEZ, É. G. Cytokines, chemokines and growth factors. In: ANAYA J-M.; SHOELFELD Y.; ROJAS-VILLARRAGA A.; LEVY R.A.;CERVERA R. (eds). **Autoimmunity: from bench to bedside**. Bogotá: El Rosario University Press, School of Medicine and Health Sciences CREA, p. 133-168, 2013.
- MORRIS, D. L.; TAYLOR, K. E.; FERNANDO, M. M.; NITITHAM, J.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E.; BARCELLOS, L. F.; BEHRENS, T. W.; COTSAPAS, C.; GAFFNEY, P. M.; GRAHAM, R. R.; PONS-ESTEL, B. A.; GREGERSEN, P. K.; HARLEY, J. B.; HAUSER, S. L.; HOM, G.; LANGEFELD, C. D.; NOBLE, J. A.; RIOUX, J. D.; SELDIN M. F.; CRISWELL, L. A.; VYSE, T. J. et al. Unraveling multiple MHC gene associations with systemic lupus erythematosus: model choice indicates a role for HLA alleles and non-HLA genes in Europeans. **Am J Hum Genet** v.91, n.5, p. 778-93, 2012.
- MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol** v.25, p. 75-84, 2004.
- MOSER, K. L.; KELLY, J. A.; LESSARD, C. J.; HARLEY, J. B. et al. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus **Genes and Immunity** v.10, n.5, p. 373–379, 2009.
- MUNTINGHE, F. L.; GROSS, S.; BAKKER, S. J.; LANDMAN, G. W.; VAN DER HARST, P.; BILO, H. J.; NAVIS, G.; ZUURMAN, M. W. CCR5Delta32 genotype is associated with outcome in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract** v.86, n.2, 2009.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, L. F.; HEBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J. J.; POWER, C. A. International Union of Pharmacology. XXII Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev** v.52, p. 145-176, 2000.

NATH, S. K.; HAN, S.; KIM-HOWARD, X.; KELLY, J. A.; VISWANATHAN, P.; GILKESON, G. S.; CHEN, W.; ZHU, C.; MCEVER, R. P.; KIMBERLY, R. P.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E.; VYSE, T. J.; Li, Q. Z.; WAKELAND, E. K.; MERRILL, J. T.; JAMES, J. A.; KAUFMAN, K. M.; GUTHRIDGE, J. M.; HARLEY, J. B. et al. A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha (M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. **Nat Genet** v.40, p. 152–154, 2008.

OLIVEIRA, K. B.; REICHE, E. M. V.; MORIMOTO, H. K.; FUNGARO, M. H. P.; ESTEVÃO, D.; PONTELLO, R.; NASSER, T. F.; WATANBE, M. A. E. et al. Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. **J Cutan Pathol** v.34, p. 27-32, 2007.

ORRÚ, V.; TSAI, S. J.; RUEDA, B.; FIORILLO, E.; STANFORD, S. M.; DASGUPTA, J.; HARTIALA, J.; ZHAO, L.; ORTEGO-CENTENO, N.; D'ALFONSO, S.; ARNETT, F. C.; WU, H.; GONZALEZ-GAY, M. A.; TSAO, B. P.; PONS-ESTEL, B.; ALARCON-RIQUELME, M. E.; HE, Y.; ZHANG, Z. Y.; ALLAYEE, H.; CHEN, X. S.; MARTIN, J.; BOTTINI, N. et al. A loss-of-function variant of *PTPN22* is associated with reduced risk of systemic lupus erythematosus. **Hum Mol Genet** v.18, p. 569–579, 2009.

PALOMINO-MORALES, R. J.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; GONZÁLEZ, C. I.; RAMÍREZ, G.; ANAYA, J. M.; MARTÍN, J. et al. *STAT4* but not *TRAF1/C5* variants influence the risk of developing rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Colombians. **Genes Immun** v.9, p.379–382, 2008.

PETREK, M.; GIBEJOVA, A.; DRABEK, J.; MRAZEK, F.; KOLEK, V.; WEIGL, E.; DU BOIS, R. M. CC chemokine receptor gene polymorphism in Czech patients with pulmonary sarcoidosis. **Am J Respir Crit Care Med** v.162, p. 1000-1003, 2000.

PETRI, M.; THOMPSON, E.; ABUSUWWA, R.; HUANG, J.; GARRETT, E.; BALES: the Baltimore lupus environmental study [abstract]. **Arthritis Rheum** n.44, 2001.

PETRI, M.; ORBAI, A. M.; ALARCÓN, G. S.; GORDON, C.; MERRIL, J. T.; FORTIN, P. R.; BRUCE, I. N.; ISENBERG, D.; WALLACE, D. J.; NIVED, O.; STURFELT, G.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; BAE, S. C.; HANLY, J. G.; SANCHEZ-GUERRERO, J.; CLARKE, A.; ARANOW, C.; MANZI, S.; UROWITZ, M.; GLADMAN, D.; KALUNIAN, K.; COSTNER, M.; WERTH, V. P.; ZOMA, A.; BERNATSKY, SASHA; RUIZ-IRASTORZA, G.; KHAMASHTA, M. A.; JACOBSEN, S.; BUYON, J. P.; MADDISON, P.; DOOLEY, M. A.; VAN VOLLENHOVEN, R. F.; GINZLER, E.; STOLL, T.; PESCHKEN, C.; JORIZZO, J. L.; CALLEN, J. P.; LIM, S. S.; FESSLER, B. J.; INANC, M.; KAMEN, D. L.; RAHMAN, A.; STEINSSON, K.; FRANKS, A. G.; SIGLER, L.; HAMEED, S.; FANG, H.; PHAM, N.; BREY, R.; WEISMAN, M. H.; MCGWIN, G.; MAGDER, L. S. Derivation and validation of systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v. 64, n. 8, p. 2677-2686, 2012.

PISTINER, M.; WALLACE, D. J.; NESSIM, S.; METZGER, A. L.; KLINENBERG, J. R. et al. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. **Semin Arthritis Rheum** v.21, p. 55–64, 1991.

POKORNY, V.; MCQUEEN, F.; YEOMAN, S.; MERRINAN, M.; MERIMAN, A.; HARRISON, A.; HIGTON, J.; MCLEAN, L. Evidence for negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** v.64, p. 487-490, 2005.

PRIORI, R.; MEDDA, E.; CONTI, F.; CASSARA, E. A.; DANIELI, M. G.; GERLI, R.; GIACOMELLI, R.; FRANCESCHINI, F.; MANFREDI, A.; PIETROGRANDE, M.; STAZI, M. A.; VALESINI, G. et al. Familial autoimmunity as a risk factor for systemic lupus erythematosus and vice versa: a case-control study. **Lupus** v.12, p. 735–740, 2003.

REICHE, E. M.; EHARA WATANABE, M. A.; BONAMETTI, A. M.; MORIMOTO, H. K.; AKIRA MORIMOTO, A.; WIECHMANN, S. L.; MATSUO, T.; CARVALHO DE OLIVEIRA, J.; VISSOCI REICHE, F. Frequency of CCR5-Delta32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of southern Brazilian population. **Int J Mol Med** v.22, p. 699-675, 2008.

RELLE, M.; SCHWARTING, A. Role of MHC-linked susceptibility genes in the pathogenesis of human and murine lupus. **Clin Dev Immunol** v.2012, 2012.

REMMERS, E. F.; PLENGE, R. M.; LEE, A. T.; GRAHAM, R. R.; HOM, G.; BEHRENS, T. W.; de BAKKER, P. I.; LE, J. M.; LEE, H. S.; BATLIWALLA, F.; LI, W.; MASTERS, S. L.; BOOTY, M. G.; CARULLI, J. P.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L.; KLARESKOG, L.; CHEN, W. V.; AMOS, C. I.; CRISWELL, L. A.; SELDIN, M. F.; KASTNER, D. L.; GREGERSEN, P. K. et al. *STAT4* and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med** v.357, p. 977–986, 2007.

RICHEZ, C.; YASUDA, K.; BONEGIO, R. G.; WATKINS, A. A.; APRAHAMIAN, T.; BUSTO, P.; RICHARDS, R. J.; LIU, C. L.; CHEUNG, R.; UTZ, P. J.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; RIFKIN, I. R. et al. IFN regulatory factor 5 is required for disease development in the FcγRIIB<sup>-/-</sup>Yaa and FcγRIIB<sup>-/-</sup> mouse models of systemic lupus erythematosus. **J Immunol** v.184, p. 796–806, 2010.

RUBTSOV, A V, RUBTSOVA K, KAPPLER J W, MARRACK P. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. **Autoimmun Rev.** v. 9, n.7, p. 494–498, 2010.

ROOD, M. J.; VAN KRUGTEN, M. V.; ZANELLI, E.; VAN DER LINDEN, M. W.; KEIJSERS, V.; SCHREUDER, G. M. T.; VERDUYN, W.; WESTENDORP, R. G. J.; DE VRIES, R. R. P.; BREEDVELD, F. C.; VERWEIJ, C. L.; HUIZINGA, T. W. J. et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.43, n.1, p. 129-134, 2000.

SACK, E. K. *Imunologia médica*. In: **Doenças Reumáticas**. Rio de Janeiro: Koogan, 2004.

- SALMON, J. E.; EDBERG, J. C.; KIMBERLY, R. P. Fcγ receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. **J Clin Invest** v.85, p. 1287–1295, 1990.
- SALMON, J. E.; MILLARD, S.; SCHACHTER, L. A.; ARNETT, F. C.; GINZLER, E. M.; GOURLEY, M. F.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; PETERSON, M. G.; KIMBERLY, R. P. et al. Fcγ RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. **J Clin Invest** v.97, p. 1348–1354, 1996.
- SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunol Today** v.19, p. 568-573, 1998.
- SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B. J.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.; FARBER, C. M. et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature** v. 382, n.722, 1996.
- SCHAUREN, J. S.; MARASCA, J. A.; VEIT, T. D.; MONTICIELO, O. A.; XAVIER, R. M.; BRENOL, J. C. T.; CHIES, J. A. B. et al. CCR5delta32 in systemic lupus erythematosus: implications for disease susceptibility and outcome in a Brazilian population. **Lupus** v.22, n.802, 2013.
- SCHEIBEL, I.; VEIT, T.; NEVES, A. G.; SOUZA, L.; PREZZI, S.; MACHADO, S.; KOHEM, C.; ICARELLI, M.; XAVIER, R.; BRENOL, J. C.; CHIES, J. A. Differential CCR5 Delta32 allelic frequencies in juvenile idiopathic arthritis subtypes: evidence for different regulatory roles of CCR5 in rheumatological diseases. **Scnd J Rheumatol** v.37, p. 13-17, 2008.
- SELLEBJERG, F.; MADSEN, H. O.; JENSEN, C. V.; JENSEN, J.; GARRED, P. CCR5 delta 32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** v.102, p. 98-106, 2000.
- SESTAK, A. L.; FÜRNRÖHR, B. G.; HARLEY, J. B.; MERRILL, J. T.; NAMJOU, B. et al. The genetics of systemic lupus erythematosus and implications for targeted therapy **Ann Rheum Dis** v.70, s.1, p. i37–i43, 2011.
- SHIN, H. D.; SUNG, Y. K.; CHOI, C. B.; LEE, S. O.; LEE, H. W.; BAE, S. C. et al. Replication of the genetic effects of IFN regulatory factor 5 (*IRF5*) on systemic lupus erythematosus in a Korean population. **Arthritis Res Ther** v.9, n.2, r.32, 2007.
- SHOENFELD, Y.; ZANDMAN-GODDARD, G.; STOJANOVICH, L.; CUTOLO, M.; AMITAL, H.; LEVY, Y.; ABU-SHAKRA, M.; BARZILAI, O.; BERKUN, Y.; BLANK, M.; CARVALHO, J. F.; DORIA, A.; GILBURD, B.; KATZ, U.; TOUBI, E.; SHERER, Y. et al. The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases. **Imaj** v.10, 2008.
- SIGURDSSON, S.; GÖRING, H. H.; KRISTJANSÐOTTIR, G.; MILANI, L.; NORDMARK, G.; SANDLING, J. K.; ELORANTA, M. L.; FENG, D.; SANGSTER-GUITY, N.; GUNNARSSON, I.; SVENUNGSSON, E.; STURFELT, G.; JÖNSEN, A.; TRUEDSSON, L.; BARNES, B. J.; ALM, G.; RÖNNBLÖM, L.; SYVÄNEN, A. C. et al. Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5

(*IRF5*) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. **Hum Mol Genet** v.17, p. 872–881, 2008a.

SIGURDSSON, S.; NORDMARK, G.; GARNIER, S.; GRUNDBERG, E.; KWAN, T.; NILSSON, O.; ELORANTA, M. L.; GUNNARSSON, I.; SVENUNGSSON, E.; STURFELT, G.; BENGTSSON, A. A.; JÖNSEN, A.; TRUEDSSON, L.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S.; ERIKSSON, C.; ALM, G.; GÖRING, H. H.; PASTINEN, T.; SYVÄNEN, A. C.; RÖNNBLUM, L. et al. A risk haplotype of *STAT4* for systemic lupus erythematosus is over expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of *IRF5*. **Hum Mol Genet** v.17, p. 2868–2876, 2008b.

SIU, H. O.; YANG, W.; LAU, C. S.; CHAN, T. M.; WONG, R. W.; WONG, W. H.; LAU, Y. L.; ALARCON-RIQUELME, M.E. et al. Association of a haplotype of *IRF5* gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. **J Rheumatol** v.35, p. 360–362, 2008.

SONG, Y. W.; HAN, C. W.; KANG, S. W.; BAEK, H. J.; LEE, E. B.; SHIN, C. H.; HAHN, B. H.; TSAO, B. P. et al. Abnormal distribution of Fcγ receptor type IIa polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** v.41, p. 421–426, 1998.

SONG, J. K.; PARK, M. H.; CHOI, D. Y.; YOO, H. S.; HAN, S. B.; YOON DO, Y.; HONG, J. T. Deficiency of C-C chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF-kappa B and upregulation of IL-1Ra in melanoma model. **PLoS One** v.7, e33747, 2012.

SUÁREZ, A.; LÓPEZ, P.; MOZO, L.; GUTIÉRREZ C. et al. Differential effect of IL10 and TNFa genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis** v.64, p. 1605-1610, 2005.

SULLIVAN, K. E.; JAWAD, A. F.; PILIERO, L. M.; KIM, N.; LUAN, X.; GOLDMAN, D.; PETRI, M. et al. Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in systemic lupus erythematosus. **Rheum (Oxford)** v.42, p. 446–452, 2003.

TAYLOR, K. E.; REMMERS, E. F.; LEE, A. T.; ORTMANN, W. A.; PLENGE, R. M.; TIAN, C.; CHUNG, S. A.; NITITHAM, J.; HOM, G.; KAO, A. H.; DEMIRCI, F. Y.; KAMBOH, M. I.; PETRI, M.; MANZI, S.; KASTNER, D. L.; SELDIN, M. F.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W.; CRISWELL, L. A. et al. Specificity of the *STAT4* genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. **PLoS Genet** v.4, n.5, 2008.

THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM (no Authors listed) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature** v.401, n.6756, p. 921-923, 1999.

TRUEDSSON, L.; BENGTSSON, A. A.; STURFELT, G. et al. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity** v.40, p. 560–566, 2007.

TSAO, B. P.; CANTOR, R. M.; GROSSMAN, J. M.; KIM, S. K.; STRONG, N.; LAU, S. L.; CHEN, C. J.; SHEN, N.; GINZLER, E. M.; GOLDSTEIN, R.; KALUNIAN, K. C.;

- ARNETT, F. C.; WALLACE, D. J.; HAHN, B. H. Linkage and Interaction of Loci on 1q23 and 16q12 May Contribute to Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheum** v.46, n.11, 2002.
- URAMOTO, K. M.; MICHET, C. J.; JR THUMBOO, J.; SUNKU, J.; O'FALLON, W. M.; GABRIEL, S. E. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. **Arthritis Rheum** v.42, p. 46-50, 1999.
- UROWITZ, M. B.; GLADMAN, D. D.; TOM, B. D.; IBAÑEZ, D.; FAREWELL, V. T. Changing patterns in mortality and disease outcomes for patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol** v.35, p. 2152-2158, 2008.
- VARGAS, A. E.; CECHIM, G.; CORREA, J. F.; GOMES, P. A.; MACEDO, G. S.; DE MEDEIROS, R. M.; PEROTONI, G.; RAUBER, R.; VILLODRE, E. S.; CHIES, J. A. Pros and cons of a missing chemokine receptor--comments on "Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-D32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?" by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). **Infect Genet Evol** v.9, p. 387-389, 2009.
- VILÁ, L. M.; MOLINA, M. J.; MAYOR, A. M.; CRUZ, J. J.; RÍOS-OLIVARES, E.; RÍOS, Z. et al. Association of serum MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol** v.26, n.5, p. 718-722, 2007.
- VILAR, M. J.; SATO E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus** v.11, n.8, p. 528-532, 2002.
- VYSE, T. J.; KOTZIN, B. L. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus **Annu Rev Immunol** v.16, p. 261-292, 1998.
- WALLACE, D. J.; Antimalarials – the ‘real’ advance in lupus. **Lupus** v.10, n.6, p. 386-387, 2001.
- WALPORT, M. J.; DAVIES, K. A.; BOTTO, M. et al. C1q and systemic lupus erythematosus. **Immunobiol** v.199, p. 265-285, 1998.
- WANG, F. S.; HONG, W. G.; CAO, Y.; LIU, M. X.; JIN, L.; HU, L. P. et al. Population survey of CCR5 delta32, CCR5m303, CCR2b 64I, and SDF1 3'A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups. **J Acquir Immune Defic Syndr** v.32, n.124, 2003.
- WATSON, M. L.; RAO, J. K.; GILKESON, G. S.; RUIZ, P.; EICHER, E. M.; PISETSKY, D. S.; MATSUZAWA, A.; ROCHELLE, J. M.; SELDIN, M. F. et al. Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. **J Exp Med** v.176, n.6, p.1645-1656, 1992.
- WU, Y. L.; HAUPTMANN, G.; VIGUIER, M.; YU, C. Y. et al. Molecular basis of complete complement C4 deficiency in two North-African families with systemic lupus erythematosus. **Genes Immun** v.10, n.5, p. 433-445, 2009.

WUCHERPFENNIG, K. W. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. **J Clin Invest** v.108, n.8, p. 1097-1104, 2001.

YAMADA, M.; YAGITA, H.; INOUE, H.; TAKANASHI, T.; MATSUDA, H.; MUNECHIKA, E.; KANAMARU, Y.; SHIRATO, I.; TOMINO, Y.; MATUSHIMA, K.; OKUMURA, K.; HASHIMOTO, H. et al. Selective accumulation of CCR4 T lymphocytes into renal tissue of patients with lupus nephritis. **Arthritis Rheum** v.46, n.3, p. 735-740, 2002.

YAMADA, M.; ORITANI, K.; KAISHO, T.; ISHIKAWA, J.; YOSHIDA, H.; TAKAHASHI, I.; KAWAMOTO, S.; ISHIDA, N.; UJIIE, H.; MASAIE, H.; BOTTO, M.; TOMIYAMA, Y.; MATSUZAWA, Y. et al. Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. **Eur J Immunol** v.34, n.1, p. 221-230, 2004.

YANG, Y.; CHUNG, E. K.; WU, Y. L.; SAVELLI, S. L.; NAGARAJA, H. N.; ZHOU, B.; HEBERT, M.; JONES, K. N.; SHU, Y.; KITZMILLER, K.; BLANCHONG, C. A.; MCBRIDE, K. L.; HIGGINS, G. C.; RENNEBOHM, R. M.; RICE, R. R.; HACKSHAW, K. V.; ROUBEY, R. A.; GROSSMAN, J. M.; TSAO, B. P.; BIRMINGHAM, D. J.; ROVIN, B. H.; HEBERT, L. A.; YU, C. Y. et al. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. **Am J Hum Genet** v.80, p. 1037–1054, 2007.

YANG, W.; SHEN, N.; YE, D. Q.; LIU, Q.; ZHANG, Y.; QIAN, X. X.; HIRANKARN, N.; YING, D.; PAN, H. F.; MOK, C. C.; CHAN, T. M.; WONG, R. W.; LEE, K. W.; MOK, M. Y.; WONG, S. N.; LEUNG, A. M.; LI, X. P.; AVIHINGSANON, Y.; WONG, C. M.; LEE, T. L.; HO, M. H.; LEE, P. P.; CHANG, Y. K.; LI, P. H.; LI, R. J.; ZHANG, L.; WONG, W. H.; NG I. O.; LAU, C. S.; SHAM, P. C.; LAU, Y. L. et al. Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in *ETS1* and *WDFY4* associated with systemic lupus erythematosus. **PLoS Genet** v.6, n.2, 2010.

YAP, S. N.; PHIPPS, M. E.; MANIVASAGAR, M.; TAN, S. Y.; BOSCO, J. J. et al. Human Fcγ receptor IIA (FcγRIIA) genotyping and association with systemic lupus erythematosus (SLE) in Chinese and Malays in Malaysia. **Lupus** v.8, p. 305–310, 1999.

YE, D. Q.; YANG, S. G.; LI, X. P.; HU, Y. S.; YIN, J.; ZHANG, G. Q.; LIU, H. H.; WANG, Q.; ZHANG, K. C.; DONG, M. X.; ZHANG, X. J. Polymorphisms in the promoter region of RANTES in Han Chinese and their relationship with systemic lupus erythematosus. **Arch Dermatol Res** v.297, n.3, p. 108-113, 2005.

YILDIRIM-TORUNER, C.; DIAMOND, B. Current and Novel Therapeutics in Treatment of SLE, **J Allergy Clin Immunol** v.127, n.2, p. 303–314, 2011.

ZUNIGA, R.; MARKOWITZ, G. S.; ARKACHAISRI, T.; IMPERATORE, E. A.; D'AGATI, V. D.; SALMON, J. E. et al. Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis: the relationship between the composition of immune deposits and FCγ receptor type IIA alleles. **Arthritis Rheum** v.48, p. 460–470, 2003.

**ANEXOS**

## ANEXO A

## Parecer do comitê de ética envolvendo seres humanos da universidade estadual de Londrina

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná

**Pesquisador:** Andréa Name Colado Simão

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 01865212.0.0000.5231

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Londrina - UEL

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 210.328

**Data da Relatoria:** 19/12/2012

**Apresentação do Projeto:**

Estudos com famílias e gêmeos sugerem que os fatores genéticos desempenham um papel significativo na predisposição ao Lupus Eritematoso Sistêmico (LES). Assim, a hipótese levantada neste projeto é de que indivíduos que apresentam polimorfismo genético nos genes que codificam a Proteína C Reativa, o HLA e o TNF apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de LES e apresentam maior estresse oxidativo. Para isso, o sangue dos indivíduos selecionados será colhido para realização de investigação gênica e dosagem de Proteína C Reativa e TNF.

**Objetivo da Pesquisa:**

Este projeto objetiva determinar a associação de polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao LES e ao aumento do estresse oxidativo em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas (AHC) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto não apresenta riscos ao paciente e a população poderá ser beneficiada com os resultados obtidos, caso a equipe de pesquisa determine fatores genéticos que possam estimar a chance de um indivíduo desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo previamente com a

**Endereço:** AVENIDA ROBERT KOCH, 60

**Bairro:** VILA OPERÁRIA

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.038-440

**Telefone:** (43)3371-2490

**E-mail:** cep268@uel.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



doença em desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica. Além disso, os resultados obtidos neste estudo poderão, também, indicar uma possível relevância da inclusão na rotina laboratorial de testes de genotipagem dos

genes indicados para indivíduos atendidos no AHC e no Hospital Universitário da UEL. Indivíduos que apresentarem um genótipo ou um conjunto de haplótipos associado ao LES poderão ser beneficiados com estratégias terapêuticas diferentes ou serem submetidos a um monitoramento clínico e laboratorial em intervalos menores de tempo, ou ambos procedimentos, o que poderá contribuir para uma melhor avaliação e monitorização clínica destes indivíduos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O Projeto está bem estruturado e é relevante para o avanço das investigações sobre LES.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todas as pendências foram respondidas adequadamente.

**Recomendações:**

Encaminhar relatório ao final do estudo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezada Pesquisadora,

Favor retirar seu parecer de aprovação junto ao CEP/UEL.

**Endereço:** AVENIDA ROBERT KOCH, 60

**Bairro:** VILA OPERÁRIA

**CEP:** 86.038-440

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-2490

**E-mail:** cep268@uel.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



LONDRINA, 04 de Março de 2013

---

Assinador por:

**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
(Coordenador)

**Endereço:** AVENIDA ROBERT KOCH, 60

**Bairro:** VILA OPERÁRIA

**CEP:** 86.038-440

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-2490

**E-mail:** cep268@uel.br

## ANEXO B

## Termo de consentimento livre e esclarecido

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - pacientes****Título da pesquisa:**

**“Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná,”** realizada no “Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL), Londrina, Paraná”. O objetivo da pesquisa é “determinar se existe associação entre fatores genéticos do indivíduo e a chance de desenvolver LES e se existe associação com o quadro clínico da doença”. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: no momento da entrada no projeto de pesquisa, será realizada uma avaliação clínica e coleta de 20 mL de sangue periférico para realização de exames laboratoriais relacionados ao LES, e uma entrevista para você fornecer informações sobre estilos de vida como dieta e exercícios físicos. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos, ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

As amostras de sangue coletadas serão identificadas por códigos com letra e número garantindo o absoluto sigilo e confidencialidade dos resultados. Após sua utilização, as amostras serão armazenadas em *freezer* sob a responsabilidade do pesquisador responsável para outros estudos genéticos relacionados ao LES.

A participação no projeto não apresenta riscos ao (a) senhor (a) e a população poderá ser beneficiada com os resultados obtidos, caso a equipe de pesquisa determine fatores genéticos que possam estimar a chance de um indivíduo desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo previamente com a doença em desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar: **Professora Dra. Andrea Name Colado Simão, no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UEL, fone 43-3371-2321, e-mail: [deianame@yahoo.com.br](mailto:deianame@yahoo.com.br)**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

**Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andrea Name Colado Simão**

*RG: 6226736-4*

\_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - controles

### Titulo da pesquisa:

**“Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, realizada no “Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL), Londrina, Paraná”. O objetivo da pesquisa é “Determinar se existe associação entre fatores genéticos do indivíduo e a chance de desenvolver LES e se existe associação com o quadro clínico da doença”. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma (avaliação clínica, coleta de sangue periférico para realização de exames laboratoriais relacionados ao LES, fornecer informações sobre estilos de vida como dieta e exercícios físicos. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Sua participação é importante para compor o grupo de indivíduos saudáveis que serão utilizados para a comparação dos resultados obtidos com o grupo de pacientes com a doença.

As amostras de sangue coletadas serão identificadas por códigos garantindo o absoluto sigilo e confidencialidade dos resultados. Após sua utilização, as amostras serão armazenadas em *freezer* sob a responsabilidade do pesquisador responsável por outros estudos genéticos relacionados ao LES.

A participação no projeto não apresenta riscos ao (a) senhor (a) e a população poderá ser beneficiada com os resultados obtidos, caso a equipe de pesquisa determine fatores genéticos que possam estimar a chance de um indivíduo desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo com a doença em desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica. Os resultados serão discutidos entre os pesquisadores da área e poderão contribuir para a implantação de novos exames laboratoriais

possam estimar a chance de um indivíduo desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo com a doença em desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (**Professora Dra. Andrea Name Colado Simão, no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UEL, fone 43-3371-2321, e-mail: [deianame@yahoo.com.br](mailto:deianame@yahoo.com.br)**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

**Pesquisador Responsável**

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

## ANEXO C

## Questionário para a coleta de dados demográficos, antropométricos, clínicos e laboratoriais

<b>Dados demográficos</b>		N° do Controle:	
Nome			
Endereço			
Telefone			
Data de nascimento			
Faz uso de algum medicamento?	Quais? Qual dosagem?		
Tem alguma Doença?			
Etnia	( ) Caucasiano ( ) Negro ( ) Mulato ( ) Asiático		
Cor da pele	( ) Branca ( ) Negra ( ) Pardo ( ) Amarela		
Exposição solar diária	( ) Não se expõe ao sol diariamente ( ) Baixa exposição ( $\leq 20$ min/dia) ( ) Exposição solar adequada ( $> 20$ min/dia)		
Usa protetor solar?	( ) Sim ( ) Não Qual a frequência?		
Tabagismo	( ) Sim ( ) Não		
Consumo de álcool	( ) Sim ( ) Não		
Profissão			
Hábitos de dieta	( ) Suplementação alimentar ( ) Antioxidante ( ) Vitaminas ( ) Dieta específica		
	Obs:		
<b>Dados Clínicos</b>			
IMC:	Peso:	Altura:	Circunferência:
Pressão arterial:	Atividade física?	( ) Sim ( ) Não Quantas vezes?	
Teve Inflamação/ Infecção na última semana?	( ) Sim ( ) Não	Qual?	
Pós Menopausa	( ) Sim ( ) Não	Data da última menstruação:	