



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO ALEXANDRE SEKIGUCHI

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO *FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) BETA* +252 G>A (rs909253) COM OS NÍVEIS PASMÁTICOS DE TNF-ALFA E COM AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM ATIVIDADE

Londrina
2018

BRUNO ALEXANDRE SEKIGUCHI

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO *FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) BETA +252 G>A (rs909253)* COM OS NÍVEIS PASMÁTICOS DE TNF-ALFA E COM AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM ATIVIDADE

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

Orientador: Prof. Dr. Isaias Dichi
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Name Colado Simão

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Sekiguchi, Bruno Alexandre.

Associação do polimorfismo genético do fator de necrose tumoral (TNF) BETA +252 G>A (rs909253) com os níveis plasmáticos de TNF-ALFA e com autoanticorpos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em atividade / Bruno Alexandre Sekiguchi. - Londrina, 2018.
58 f. : il.

Orientador: Isaias Dichi.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.

Inclui bibliografia.

1. lúpus eritematoso sistêmico - Tese. 2. autoanticorpos - Tese. 3. SLEDAI - Tese. 4. polimorfismo - Tese. I. Dichi, Isaias. II. Simão, Andréa Name Colado. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

BRUNO ALEXANDRE SEKIGUCHI

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO *FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) BETA +252 G>A (rs909253)* COM OS NÍVEIS PASMÁTICOS DE TNF- α E COM AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM ATIVIDADE

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

BANCA EXAMINADORA

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Name
Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Sayonara Rangel Oliveira Cazarin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de março 2018.

Dedico este trabalho a minha noiva
Marcela Caroline Schmit.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha noiva Marcela Caroline Schmit pelo incentivo e a compreensão ao longo de todo trabalho e por ter me dado apoio necessário para que eu pudesse concluir esta etapa. Agradeço a minha família pela compreensão e suporte.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Isaias Dichi e Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão por terem me aceitado como orientando, pela paciência que tiveram diante de tantos desafios, pelas críticas construtivas que foram imprescindíveis para completar este trabalho. Agradeço pelas oportunidades que me deram nesses últimos dois anos que apesar de minhas limitações, nunca desistiram de apostar em mim.

Agradeço aos professores Dra. Edna Maria Vissoci Reiche e Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy pela importante participação na banca examinadora de qualificação e contribuição na realização deste trabalho.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de obter mais uma formação, em especial ao curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Agradeço a todos os pacientes que participaram deste estudo pela disposição e colaboração.

Agradeço a todos os meus colegas do laboratório de Imunologia do Hospital Universitário de Londrina pelo apoio e ensinamentos que foram fundamentais para realização deste trabalho, agradeço a Daniela Frizon Alfieri, pois a sua participação foi de extrema importância para realização desse trabalho, agradeço pela paciência que teve comigo, apesar das minhas limitações.

Agradeço aos funcionários do laboratório de Imunologia do Hospital Universitário de Londrina que participaram direta e indiretamente.

SEKIGUCHI, Bruno Alexandre. **Associação do polimorfismo genético do fator de necrose tumoral (*tnf*) beta +252 g>a (rs909253) com os níveis plasmáticos de *tnf*-alfa e com autoanticorpos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em atividade.** 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Introdução: O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica de origem multifatorial cuja etiologia inclui fatores genéticos, hormonais e ambientais. Os genes do Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e TNF- β são candidatos importantes na resposta inflamatória, estão próximos entre si e localizados dentro do locus que compõem o Antígeno Leucocitário Humano de classe III que está localizado no braço curto do cromossomo 6. A fisiopatologia do LES caracteriza-se pela produção de autoanticorpos contra inúmeras estruturas nucleares. O polimorfismo *TNF- β* (rs909253) na posição +252 no primeiro intron, consistindo de uma base guanina, caracteriza o alelo B1 e uma adenina caracteriza o alelo B2 +252 G>A. Esse polimorfismo de nucleotídeo único que tem sido associado com alterações nos níveis de TNF- α e falha na regulação de sua síntese, em locais de lesão imunológica, leva à ativação crônica das células da resposta imunes que potencialmente causam dano tecidual. **Objetivo:** Avaliar a associação entre o polimorfismo *TNF- β* +252 G>A (rs909253) com a susceptibilidade ao LES, níveis plasmáticos de TNF- α e a presença de autoanticorpos em pacientes com LES em atividade. **Método:** Este estudo caso-controle incluiu 195 pacientes com LES atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina e 226 indivíduos saudáveis (controles) da mesma área geográfica. Os pacientes foram diagnosticados de acordo com os critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia em 1997. A atividade da doença foi determinada utilizando o escore SLEDAI e foi considerada doença em atividade quando SLEDAI ≥ 6 . O polimorfismo genético foi estudado pelo método de reação em cadeia da polimerase seguido pelo polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Os níveis plasmáticos de TNF- α e dos autoanticorpos, anti-dsDNA (DNA de dupla fita), anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Smith (anti-Sm), anti-URNP e anti-nucleossoma, foram determinados pelo ensaio de imunoabsorção ligado em enzima. Os níveis séricos dos componentes C3 e C4 do sistema complemento foram determinados por turbidimetria. **Resultados:** Não foram observadas diferenças entre pacientes e controles na frequência alélica e na distribuição de genótipos quando avaliados nos modelo aditivo e modelo recessivo. Pacientes com genótipo B2/B2 apresentaram maiores níveis plasmáticos de TNF- α ($p=0,040$) quando comparados ao grupo com a presença do alelo B1. No entanto, após a correção para idade, sexo, índice de massa corpórea (IMC), tratamento e atividade da doença, os níveis de TNF- α não permaneceram associados ao genótipo B2/B2. Somente pacientes portadores de genótipo B2/B2 com doença em atividade apresentaram níveis mais elevados de anti-dsDNA e anti-Sm e baixos níveis de C4, independentemente dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais. Além disso, pacientes com genótipo B2/B2 e com a presença de anti-dsDNA (OR:4,50, IC 95%: 1,61-12,54), anti-Sm (OR:16,87, IC 95%: 1,97-44,38) ou ambos (OR:12,23, IC 95%: 1,40-46,86), foram independentemente associados a doença em atividade, independentemente dos dados demográficos e clínicos. **Conclusão:** O polimorfismo do *TNF- β* +252 G>A não foi associado à susceptibilidade ao LES, à atividade da doença e aos níveis plasmáticos

de TNF- α e autoanticorpos em pacientes com LES. No entanto, a interação entre doença em ativa e a presença do genótipo B2/B2 foi associada com os níveis de anti-dsDNA e anti-Sm.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Autoanticorpos. SLEDAI. Polimorfismo do TNF- β +252 G>A. TNF- α .

SEKIGUCHI, Bruno Alexandre. **Association of the genetic polymorphism of the necrosis factor (*tnf*) beta +252 g>a (rs909253) with the plasmatic levels of *tnf*-alpha and with autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus in activity.** 2018. 78 p. Dissertation (Master Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease of multifactorial origin, which includes genetic, hormonal and environmental factors. Tumor Necrosis Factor (TNF) - α and TNF- β genes are important candidates in the inflammatory response, are close to the genes that make up the Class III Human Leukocyte Antigen that is located in the short arm of chromosome 6. *TNF- β* polymorphism (rs909253) at the position +252 within the first intron, consisting of a guanine base, characterizes the B1 allele, whereas an adenine base characterizes the B2 allele +252 G>A. This single nucleotide polymorphism (SNP), which has been associated with changes in TNF- α levels and failure to regulate TNF- α synthesis, at sites of immunological injury, leads to chronic activation of innate immune cells and chronic inflammatory responses that potentially cause tissue damage. **Objective:** To evaluate the association between the *TNF- β* +252 G>A (rs909253) polymorphism with the susceptibility for SLE, TNF- α levels, and presence of autoantibodies in patients with active SLE. **Method:** This cross-sectional study included 195 patients with SLE and 226 healthy subjects from the same geographic area. SLE was diagnosed using the American College of Rheumatology (ACR) criteria (1997) and the disease activity was determined using SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score. Patients with SLEDAI ≥ 6 were classified as having active disease. The genetic polymorphism was studied by using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length (PCR-RFLP). Active disease was categorized when SLEDAI ≥ 6 . Serum TNF- α levels, anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA), anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Smith (anti-Sm), anti-URNP, and anti-nucleosome) were determined by enzyme linked immunosorbent assay. Serum levels of complement component C3 and C4 were determined by turbidimetry. **Results:** No differences were observed among patients and controls in allele frequency and genotype distribution when evaluated in an additive as well as in a dominant model. Patients with B2/B2 genotype showed higher plasmatic TNF- α levels ($p=0.040$). However, after correction to age, sex, body mass index (BMI), treatment and disease activity, TNF- α levels did not remain associated. Only patients carrying B2/B2 genotype with active disease showed higher levels of anti-dsDNA and anti-Smith and lower levels of C4, independently of demographic, clinical, and other laboratorial data. Moreover, plasma TNF- α levels in patients with B2/B2 genotype and the presence of anti-dsDNA (OR:4.50, IC 95% 1.61-12.54), anti-Sm (OR:16.87, IC 95% 1.97-44.38) or both (OR: 12.23, IC 95% 1.40-46.86) were independently associated with disease activity, independently of demographic and clinical data. **Conclusion:** *TNF- β* +252 G>A polymorphism was not associated with SLE susceptibility, disease activity, TNF- α and autoantibodies levels in Brazilian patients. However, the interaction between active disease and B2/B2 genotype could propitiate a microenvironment is associated with anti-dsDNA and anti-Sm.

Keywords: Systemic lupus erythematosus. Autoantibodies. SLEDAI. *TNF- β* +252 G>A polymorphism. TNF- α .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Envolvimento de dsDNA na fisiopatologia do LES.....	6
Figura 2:	Estrutura do U1snRNP.....	8
Figura 3:	Ações regulatórias do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	12

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACR	American College of Rheumatology (Colégio Americano de Reumatologia)
AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
ANA	Antinuclear antibodies (Anticorpos antinucleares)
ANOVA	Análise de variâncias
Anti-CENP-B	Anticorpos anti-CENP-B
Anti-dsDNA	Anti-double-stranded DNA antibody (Anticorpos anti-DNA de cadeia dupla)
Anti-La/SSB	Anticorpos anti-La/SSB
Anti-PCNA	Antibody anti-proliferating cell nuclear antigens (Anticorpo anti-antígeno nuclear de célula proliferativa)
Anti-PM-Scl	Antibody anti-polymyositis-scleroderma (Anticorpo anti-polimiosite-esclorodermia)
Anti-Ro/SSA	Anticorpos anti-Ro/SSA
Anti-Sm	Anticorpos anti-Smith
Anti-URNP	Anticorpos anti-U ribonucleoproteína
APC	Antigen presenting cell (Célula apresentadora de antígeno)
BLYS	Estimulador de linfócitos B
C3	Componente do complemento C3
C4	Componente do complemento C4
DC	Dendritic cells (células dendríticas)
DMTC	Doença mista do tecido conjuntivo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima)
ENAs	Extractable nuclear antigens (Antígenos extraíveis do núcleo)
FADD	Fas-associated death domain (Proteína de domínio de morte associada a Fas)
Fc	Fragment crystallizable (Fragmento cristalizante)
Fcy	Fragment crystallizable gamma (Fragmento cristalizante gama)

G	Guanina
IC	Intervalo de confiança
IFN-I	Interferon I
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulin (Imunoglobulina)
IgG	Imunoglobulin gamma (Imunoglobulina gama)
I-kB	Inhibitor kB (Inibidor de kB)
KDa	Kilo Dalton (quilo Dalton)
IFI	Imunofluorescência indireta
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LB	Linfócito B
HLA	Human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano)
LTA	Linfotoxina alfa
MHC	Major histocompatibility complex (Complexo de histocompatibilidade principal)
Nco1	Enzima de restrição Nco1
NF-kB	Nuclear factor kappa B (Fator nuclear kappa B)
NIK	NF-kB inductor kinase (Quinase indutora de NF-kB)
NK	Natural Killer cells (Células assassinas naturais)
OR	Odds ratio (Razão de chance)
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase (Poli (ADP-ribose) polimerase)
pb	Pares de base
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PHA	Phytohemagglutinin (fitohemaglutinina)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição)
RIP-1	Receptor-interacting protein 1 (Proteína integradora de receptor 1)
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoprotein (Ribonucleoproteína)
SEM	Error standard of main (erro padrão da média)

SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Activity Index (Índice de atividade do lúpus eritematoso sistêmico)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de um único nucleotídeo)
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein (Pequenas ribonucleoproteínas nucleares)
ssDNA	Simple-stranded DNA (DNA de fita simples)
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha (Fator de necrose tumoral alfa)
TNF- β	Tumor necrosis factor beta (Fator de necrose tumoral beta)
TNFB1	Alelo B1 do polimorfismo do TNF- β +252
TNFB2	Alelo B2 do polimorfismo do TNF- β +252
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1 (Receptor 1 do fator de necrose tumoral)
TNFR2	Tumor necrosis factor receptor 2 (Receptor 2 do fator de necrose tumoral)
TRAF-2	TNF receptor-associated factor (Fator 2 associado ao receptor de TNF)
TRADD	TNFR1-associated death domain protein (TNFR1-associado à proteína de domínio de morte)
TReg	Linfócito T regulatório
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	15
1.2.	Fisiopatologia.....	17
1.3.	Autoanticorpos no LES.....	20
1.4.	Tratamento.....	23
1.5.	TNF e LES.....	24
1.6.	Polimorfismo do <i>TNF-β</i> +252 G>A (rs909253).....	26
2.	Justificativa.....	32
3.	Objetivos.....	33
3.1.	Objetivo Geral.....	33
3.2.	Objetivos Específicos.....	33
4.	Sujeitos e Métodos.....	34
4.1.	População, Amostra e Delineamento.....	34
4.2.	Aspectos Éticos.....	34
4.3.	Dados Demográficos, Clínicos e Epidemiológicos.....	35
4.4.	Medidas Antropométricas.....	35
4.5.	Exames Laboratoriais.....	35
4.6.	Avaliação do Polimorfismo Genético do <i>TNF-β</i> +252 A/G.....	36
4.7.	Dosagem dos Níveis Plasmáticos de TNF-α.....	38
4.8.	Pesquisa de Autoanticorpos.....	38
4.9.	Dosagem de C3 e C4.....	38
4.10.	Análise Estatística.....	39
5.	Resultados.....	40
6.	Conclusões da Dissertação.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	APÊNDICES.....	70
	ANEXOS.....	75

1.Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica que afeta múltiplos sistemas, caracterizada pela produção de diversos autoanticorpos. A doença evolui de forma polimórfica, com períodos de remissão e exacerbação. A etiologia do LES não é totalmente esclarecida, mas acredita-se que fatores hormonais (estrógeno), genéticos (mais de 200 *loci* diferentes codificando variantes do *Human leucocyte antigen*) e ambientais (infecções, radiação ultra violeta e intervenções com drogas) estejam envolvidos (BORBA et al., 2008; KAMAL e KHAMASHTA, 2014). Os linfócitos B (LB) exercem um importante papel na patogênese do LES, seja na produção de citocinas, na apresentação de antígenos próprios e ativação de linfócitos T ou ainda na produção de diversos autoanticorpos contra diferentes componentes nucleares (DNA, RNA, histonas e proteínas não histonas) (MERRILL et al., 2010; SHIRAI e HIROSE, 2006). A deposição de imunocomplexos formados por autoanticorpos contra antígenos próprios causam respostas inflamatórias importantes e complexos contendo imunoglobulina gama (IgG) são particularmente patogênicos pois ativam sistema complemento e leucócitos pela porção cristalizante (Fc) (CARROLL, 2004). Os fenômenos inflamatórios causam danos teciduais que podem se manifestar na forma de serosites, distúrbios renais, vasculites, artrite, e doenças do sistema nervoso (FORTE et al., 2003).

O LES pode acometer pessoas de qualquer faixa etária, sexo e etnia; no entanto, apresenta maior prevalência e incidência em mulheres entre 20 e 40 anos e em afro-americanos e afro-caribenhos. Tem sido demonstrado que aproximadamente a cada 10 pacientes com LES, nove são mulheres (TOUMA e GLADMAN, 2017). A taxa de incidência varia entre 0,3 a 31,5 novos casos a cada 100.000 habitantes/ano, sendo no Brasil de 8,7 a cada 100.000 habitantes. A prevalência varia entre 3,2 a 517,5 casos a cada 100.000 habitantes, sendo no Brasil 98 casos a cada 100.000 habitantes (CARTER et al., 2016). Os valores de incidência e prevalência podem variar bastante devido a fatores demográficos e genéticos. A taxa de sobrevivência do LES aumentou significativamente nos últimos anos, variando de menos de 50% em 1950 para mais de 95% no começo do século

21. Pacientes com LES tem uma taxa de mortalidade 2 a 4 vezes maior quando comparados com indivíduos saudáveis (FORTUNA e BRENNAN, 2013).

Em 1982, o Colégio Americano de Reumatologia (CAR) propôs um conjunto de critérios necessários para diagnosticar LES (TAN et al., 1982) e, em 1997, esses critérios foram atualizados. Assim, será diagnosticado com LES o paciente que apresentar quatro dos 11 critérios propostos pelo CAR com 85% de sensibilidade e 95% de especificidade. Os 11 critérios consistem em: *rash* malar, presença de lesões discoides, fotossensibilidade, úlceras orais, artrite (não erosiva de 2 ou mais articulações), serosites, manifestações renais (proteinúria maior que 0,5g/dia ou presença de cilindros), manifestações neurológicas (convulsão, psicose), transtornos hematológicos (anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia, plaquetopenia), alterações imunológicas (presença de anticorpos anti-dsDNA, anti-Sm ou antifosfolípidos) e pesquisa positiva para anticorpos antinucleares (HOCHBERG., 1997). Em 2012 foi sugerido que entre os 4 critérios utilizados para o diagnóstico o paciente apresente pelo menos um critério clínico e um laboratorial (PETRI et al., 2012).

A comprovação da atividade da doença pode ser bastante desafiadora, pois a doença pode afetar qualquer órgão e não há um biomarcador que reflita adequadamente a sua atividade. Haja visto esse problema, índices foram criados para avaliar a atividade do LES. O índice de atividade do LES (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index -SLEDAI*) é comumente utilizado para avaliar atividade da doença. O SLEDAI é sensível para variações na atividade da doença mas não para avaliar gravidade do prognóstico (YEE et al., 2008). Este instrumento consiste na avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais, considerando os órgãos acometidos e avaliando-se a atividade da doença dos últimos 10 dias. As definições de atividade são classificadas da seguinte forma: LES inativo: score 0; atividade leve: scores de 1 a 5; atividade moderada: scores de 6 a 10; atividade alta: scores 11 a 19; atividade muito alta: scores maiores ou iguais a 20 (FREIRE et al., 2011).

1.2. Fisiopatologia

A etiologia do LES é multifatorial, incluindo a genética e fatores ambientais que levam à apresentação de autoantígeno, produção de autoanticorpos, inflamação crônica e danos nos tecidos (SHRIVASTAV e NIEWOLD, 2013). O dsDNA é restrito estritamente ao núcleo e mitocôndria, mas pode ser liberado dessas organelas no processo de morte celular (PISETSKY, 2012). A morte celular que inclui apoptose, necrose e NETose (morte celular especial de neutrófilos pelas NETs), é a principal fonte de auto-dsDNA que ativa o sistema imunológico e leva a doença autoimune (MAHAJAN et al., 2016).

A apoptose também é chamada de morte celular programada, que é crucial para manter a homeostase do tecido em desenvolvimento e envelhecimento. O processo de apoptose, geralmente, inclui encolhimento celular, remodelação do citoesqueleto, condensação de cromatina, fragmentação nuclear, protrusão da membrana plasmática e formação do corpo apoptótico (BIERMANN et al., 2013). Normalmente, células apoptóticas são fagocitadas imediatamente por fagócitos e degradadas nos lisossomos sem causar inflamação e resposta imune. A integridade da membrana celular é conservada e os fagócitos secretam citocinas anti-inflamatórias (BIERMANN et al., 2013). Contudo, células apoptóticas que não são limpas de forma rápida e eficiente sofrem necrose secundária, acompanhada de ruptura da membrana celular e posterior liberação de antígenos intracelulares, incluindo auto-dsDNA (WU et al., 2001). Vale ressaltar que a necrose primária desencadeada por fatores exógenos também leva à liberação de material intracelular que contribui para o desenvolvimento de doenças autoimunes (ANAM et al., 2009; ESPOSITO et al., 2014). A NETose é uma morte celular especial executada por neutrófilos, em que o DNA nuclear, histonas e grânulos são expelidos das células que formando NETs (GALLUZZI et al., 2015). Além disso, outros tipos de células, como eosinófilos e mastócitos, são submetidas a morte celular por um mecanismo semelhante. A este respeito, a NETose não é limitada para neutrófilos, mas representa uma nova classe de morte celular com liberação de redes extracelulares (GUIMARÃES-COSTA et al., 2012). No cenário fisiológico, macrófagos derivados de monócitos limpam NETs de forma eficiente, e este processo é facilitado pelo pré-processamento extracelular de NETs pela DNase I e

C1q (FARRERA e FADEEL, 2013). Depois de serem ingerido por macrófagos, as NETs são transportadas via fagossomos para os lisossomos para degradação. A absorção das NETs por macrófagos não induz inflamação e secreção de citocinas, indicando que este processo é imunologicamente silencioso (FARRERA e FADEEL, 2013). Um defeito nesse processo faz com que haja um acúmulo de autoantígenos incluindo dsDNA (KNIGHT et al., 2015; NAPIREI et al., 2000; VILLANUEVA et al., 2011), embora outro estudo tenha mostrado um papel protetor de NETs no SLE (KIENHÖFER et al., 2017). Recentemente, evidências emergentes indicam que o auto-dsDNA liberado da morte celular desempenha um papel crucial na patogênese do LES (BAI et al., 2018).

O dsDNA de mamíferos é um hapteno imungênico capaz de ativar linfócitos B quando combinado com um estímulo apropriado, como o fatores co-estimuladores de T células auxiliares ou linfócitos B. Proteínas de ligação ao DNA derivados de agentes patogênicos podem aumentar a imunogenicidade de auto-dsDNA, resultando em produção de anticorpos anti-dsDNA (BAI et al., 2018).

Uma vez que o anticorpo anti-dsDNA é produzido, ele se liga ao seu alvo, o DNA, para formar o IC que pode circular no sangue ou ser depositado em tecidos. Células apresentadoras de antígenos (APC) tais como células dendríticas convencionais (DCs), macrófagos e as pDCs internalizam esses IC e secretam uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN-I. O IFN-I é produzido por células imunes inatas na presença de ácidos nucleares virais e bacterianos, bem como o auto-dsDNA. IFN-I promove as funções de células T e B autorreativas. O IFN-I reduz significativamente o limiar de ativação das células T e B (CROW, 2014) prolonga a sobrevivência das células T ativadas e promove desenvolvimento de células T de memória (ELORANTA e RÖNNBLÖM, 2016). Além disso, o IFN-I suprime as funções das células T regulatórias (Treg) e aumenta diferenciação de células Th17, que resultará em uma expansão de células T autorreativas (ALUNNO et al., 2012). Em relação às células B, IFN-I induz a produção do estimulador de linfócitos B (BLyS), promovendo ativação e diferenciação de células B através de receptores de células B, e facilita a troca de classe de Ig para gerar autoanticorpos potencialmente patogênicos (LÓPEZ et al., 2016).

O anti-dsDNA, desempenha um papel fundamental na internalização de complexos anti-DNA contidos através da ligação à superfície de Fcγ receptor II (FcγRII) na superfície celular de APC (BAVE et al., 2003; RÖNNBLÖM et al., 2003). Além disso, os anticorpos anti-dsDNA também se ligam a antígenos, expressos na membrana endotelial basal glomerular e vascular, para iniciar danos nos tecidos e nos órgãos (D'ANDREA et al., 1996; RAZ et al., 1989). Em conclusão, os anticorpos anti-dsDNA participam da patogênese do LES ao formar IC, assim promovendo a absorção celular anti-dsDNA pelas APCs que ativam a produção de IFN-I através de sensores de DNA (figura 1).

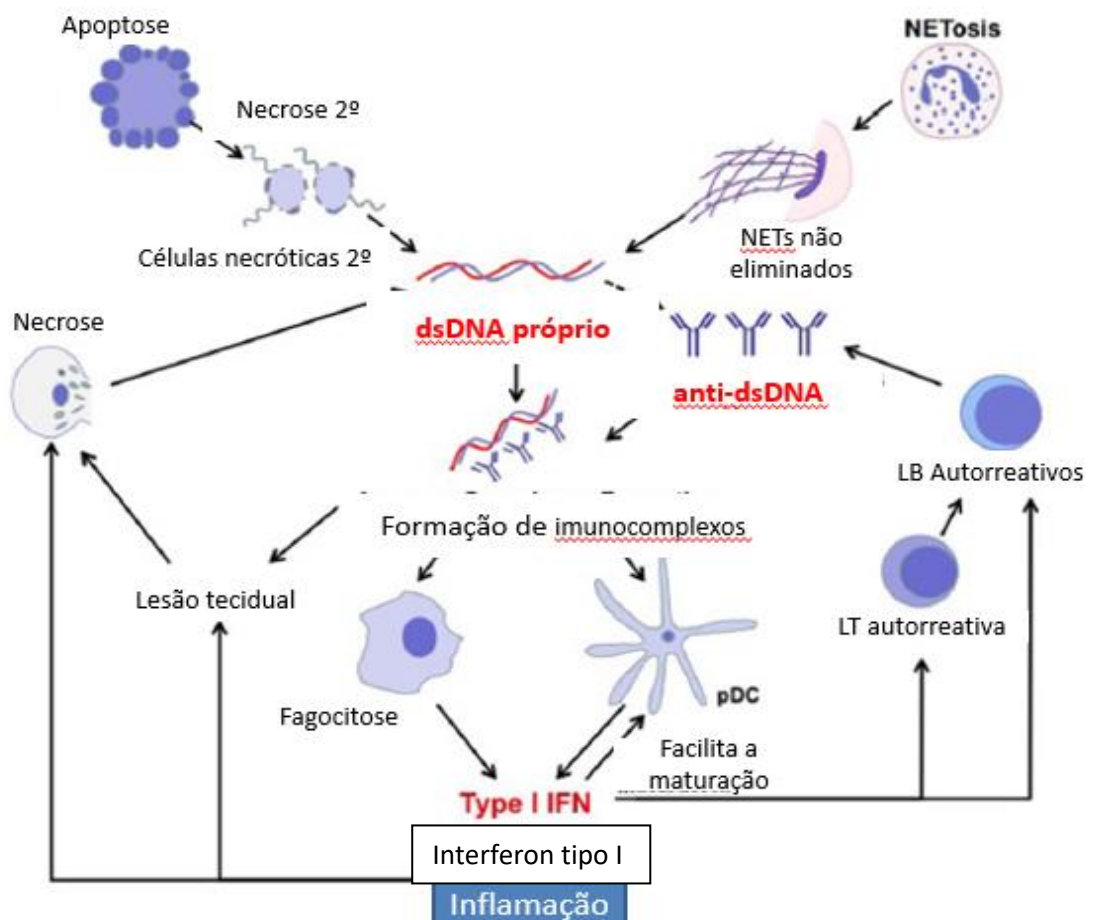


Figura 1:Envolvimento do dsDNA na fisiopatologia do LES. Em pacientes com LES a limpeza dos produtos apoptóticos é defeituosa, promovendo exposição de antígenos próprios como o DNA de dupla fita (dsDNA), que induz produção de autoanticorpos. O anti-dsDNA é produzido por células B autorreativas com auxílio de células T autorreativas. Imunocomplexos formados por anticorpo e autoantígeno ativam a produção de interferon do tipo I (IFN-I) por fagócitos e células dendríticas plasmocitoides (pDC). O IFN-I é um fator importante na fisiopatologia do LES atuando em reações inflamatórias, lesão tecidual, maturação de células dendríticas e ativação de linfócitos B (LB) e T (LT). Fonte: adaptado de BAI et al. (2018)

1.3. Autoanticorpos no LES

O anti-SSA/Ro é um autoanticorpo cujo alvo é o sistema antigênico Ro ribonucleoproteína (Ro RNP) que é constituído por duas subunidades, uma de 52 kDa e a outra com 60 kDa. A porção de 60 kDa liga-se a pequenos RNAs citoplasmáticos conhecidos como hY-RNA. Nas células humanas, existem quatro tipos de hY-RNA, sendo esses hY1, hY3, hY4 e hY5, variando o seu tamanho de 84 a 112 nucleopeptídeos (FRANCESCHINI e CAVAZZANA, 2005). Anticorpos anti-SSA/Ro estão associados a doenças autoimunes como síndrome de Sjogren primária (presente em 96% dos casos) e secundária (80% de sensibilidade), presente em 60% dos casos de lúpus eritematoso cutâneo subagudo (LECS) e no lúpus neonatal em 90% dos casos. São encontrados em 30 a 40% em pacientes com LES e, quando presentes em concomitância com anticorpos com anti-SSB/La, os pacientes apresentam uma forma mais branda da doença com menos manifestações renais (CONRAD et al., 2007; FRANCESCHINI e CAVAZZANA, 2005; NOVAK et al., 2017).

Anticorpos anti-SSB/La tem como alvo o antígeno SSB/La, denominado previamente de antígeno Ha ou SjT (*Sjogren's syndrome, reference serum TRA*), que está localizado no núcleo e no citoplasma celular. O antígeno SjT consiste de uma proteína fosforilada de 48 kDa que se liga a produtos da RNA polimerase III resultando em alteração conformacional da enzima. A presença de anti-La/SSB também está associada à Síndrome de Sjogren com 40% de sensibilidade quando testado por imunodifusão e 70% quando a metodologia é o ensaio imunoenzimático (ELISA). No LES são detectados em 7 a 45% dos pacientes, 70% no lúpus neonatal e 35% no LECS (CONRAD et al., 2007; FRANCESCHINI e CAVAZZANA, 2005; NOVAK et al., 2017).

As pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) formam um complexo RNA-proteína e são encontradas em todas as células eucarióticas, e quando juntas com proteínas específicas, formam o espliceossoma. O snRNP é composto por quatro subunidades, sendo elas U1, U2, U4 e U5. O anticorpo anti-Sm é direcionado contra sete proteínas que constituem o centro comum dessas subunidades, sendo essas proteínas B/B', D1, D2, D3, E, F e G. Os principais alvos são as proteínas

B/B', D1 e D3. D2 é um alvo mediano e as proteínas E, F e G são alvos de menor frequência e em condições específicas. O anti-RNP reconhece as proteínas A e C que, quando associadas à subunidade U1, formam o U1snRNP (Figura 2) (MIGLIORINI et al., 2005).

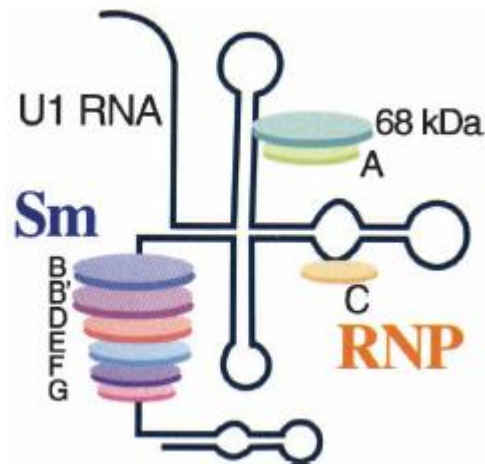


Figura 2: Estrutura do U1snRNP. kDa, quilodalton. Sm, Smith; RNP, ribonucleoproteína.

Fonte: adaptado de MIGLIORINI et al. (2005)

Anticorpos anti-Sm são extremamente específicos para LES (99%), mas apresentam pouca sensibilidade em caucasianos (5 a 15%) e em pacientes asiáticos e afro-americanos (30 a 40%) (MIGLIORINI et al., 2005; CONRAD et al., 2007). Já os anticorpos anti-RNP quando encontrados na ausência de anti-Sm e anti-dsDNA, são altamente específicos e extremamente sensíveis (100%) para doença mista do tecido conjuntivo (DMTC). Podem ser encontrados em cerca de 13 a 32% dos pacientes com LES e em 10% dos pacientes com esclerose sistêmica (CONRAD et al., 2007). Anticorpos anti-Sm e anti-RNP geralmente estão associados, e nos poucos casos onde somente o anti-Sm é detectado, o anti-RNP será detectado durante a evolução da doença. Por causa da alta especificidade do anti-Sm no LES, este anticorpo é empregado como um dos critérios para o diagnóstico da doença (ABARI., 2015)

Como já citado anteriormente, o DNA também pode se tornar imunogênico em pacientes com LES, induzindo a produção de diferentes tipos de anticorpos contra diferentes partes de sua estrutura. Anticorpos que reconhecem tanto dsDNA quanto ssDNA são direcionados para a região da ribose. Já aqueles que

reconhecem apenas o dsDNA, são direcionados contra epítomos de desoxirribose-fosfato, e os que reconhecem o ssDNA são direcionados contra as bases purínicas e pirimídicas (CONRAD et al., 2007)

O anticorpo anti-dsDNA é um dos biomarcadores mais encontrados no LES e sua detecção varia de acordo com a gravidade das manifestações clínicas, sendo superiores a 95% dos casos em pacientes com LES ativo e acometimento renal, de 50 a 70% em LES em atividade sem acometimento renal e em menos de 40% em pacientes com LES em remissão. O anti-dsDNA é considerado um marcador de prognóstico no LES e a presença desse anticorpo sugere uma manifestação clínica mais sistêmica e grave, como, por exemplo, acometimento renal e neurológico (CONRAD et al., 2007; ZEINAB et al., 2015).

Alba e colaboradores (2003), em estudo retrospectivo caso-controle, compararam 127 pacientes com nefrite lúpica e 206 pacientes com LES sem manifestações renais. Foi observada uma maior frequência dos anticorpos anti-dsDNA, anti-RNP, anti-Sm e anti-SSB/La em pacientes com nefrite lúpica.

Os anticorpos anti-dsDNA podem causar danos renais ligando-se diretamente ao DNA presente nos tecidos ou ligando-se, de modo cruzado, com antígenos não-DNA como a alfa-actina ou alfa-enolase (SEREDKINA et al., 2013). Anticorpos que reconhecem polissacarídeos bacterianos possuem a estrutura semelhante à do anti-dsDNA. Estudos demonstraram que o anti-dsDNA tem a capacidade de proteger camundongos contra infecções bacterianas (DEGIORGIO et al., 2001; LEFKOWITH et al., 1996; ZEINAB et al., 2015).

Flechsig e colaboradores (2017) investigaram, em pacientes com LES, o valor clínico dos anticorpos anti-Sm no diagnóstico, monitoramento e capacidade de prever o surto da doença comparando-o com o anti-dsDNA e os níveis de C3. Nesse estudo participaram 232 pacientes com LES e 400 doadores saudáveis, sendo observado que 14,8% dos pacientes com anti-dsDNA negativo apresentavam positividade para anti-Sm e mais de 50% dos pacientes com anti-dsDNA positivo eram também anti-Sm positivos. Apesar de não ter havido associação do anti-dsDNA com a atividade do LES, houve associação entre os níveis de anti-Sm e a proteinúria.

1.4 Tratamento

O tratamento medicamentoso do LES pode variar bastante de acordo com o quadro clínico do paciente. O local e o grau de acometimento são fatores que devem ser levados em consideração na escolha da terapia. Diante do comprometimento de vários sistemas, o tratamento deverá ser orientado para o comprometimento mais grave (BORBA et al., 2008).

Os glicocorticoides são os fármacos mais utilizados no tratamento do LES. No entanto, devido aos efeitos colaterais, os glicocorticoides devem ser utilizados na menor dose efetiva para o controle da atividade da doença e, assim que possível, deve realizar a redução gradual de sua dose (BORBA et al., 2008). As doses diárias variam de acordo a gravidade do caso. Sendo a prednisona o glicocorticoide padrão via oral, as doses podem ser divididas em (KIROU et al.,2007):

- Dose baixa: 0,125 mg/kg/dia;
- Dose moderada: 0,125-0,5 mg/kg/dia
- Dose alta: 0,6-1 mg/kg/dia
- Dose muito alta: 1-2 mg/kg/dia

Em pacientes que não conseguem atingir a dose de manutenção de glicocorticoides menor ou igual a 7,5 mg/dia, é indicada a associação de outras drogas para poupar o seu uso e consequente efeitos colaterais. Desta forma, vários outros medicamentos com atividade imunossupressora podem ser associados ao uso dos glicocorticoides.

Os antimaláricos são indicados com a finalidade de poupar os glicocorticoides, sendo a cloroquina e a hidroxicloriguina preferencialmente utilizadas (MEINÃO et al., 1996). Os antimaláricos agem aumentando a expressão de Foxp3 e diminui a secreção de IL-17 (AN et al., 2017), mas sabe-se também que reduz a possibilidade de ativação da doença (CANADIAN HYDROXYCHLOROQUINE STUDY GROUP, 1991) e melhora o perfil lipídico (BORBA et al., 2001; SACHET et al., 2007).

A azatioprina é um análogo sintético de purina, sendo estruturalmente similar à guanina e à adenina. Tem a função de suprimir células T e a produção de anticorpos por células B. A azatioprina tem meia vida curta, cerca de 3 horas, mas os metabólitos permanecem ativos extensivamente permitindo que seja administrada a cada 12 ou 24 horas (BRESSAN et al., 2010). Por causa de sua ação imunossupressora a azatioprina também é utilizada para poupar o uso de altas doses de glicocorticoides (BORBA et al., 2008).

O micofenolato de mofetila é uma droga imunossupressora utilizada em transplante de órgãos e é utilizada no tratamento de doenças autoimunes (SUEHIRO et al., 2004). O micofenolato de mofetila é um agente antiproliferativo seletivo para linfócitos, atua inibindo a inosina monofosfato desidrogenase, uma enzima chave para a síntese de purina *de novo* (LUI et al., 2002).

1.5. TNF e LES

O TNF- α e o TNF- β são citocinas com funções imunorregulatórias semelhantes, ligando-se aos mesmos receptores. O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos ativados, mas é liberado também por LB, T e células *natural killers* (NK). Já o TNF- β é produzido principalmente por células T (AHMED et al., 2014).

O TNF- α é encontrado na forma solúvel quando há ativação de células dendríticas e macrófagos, e como um trímero quando ligado a superfície celular. Ambas as formas contribuem para o desenvolvimento de órgãos linfoides secundários, como linfonodos e placas de Peyer. O TNF- α induz o crescimento de LB e a produção de interleucina (IL)1 e IL-6. Estudos demonstraram que esta citocina tem a capacidade de aumentar a proliferação de LT pela ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e aumenta a produção de IFN- γ (POSTAL e APPENZELLER, 2011). O TNF- α pode se ligar a dois tipos de receptores, o receptor 1 de TNF (TNFR1) e o receptor 2 de TNF (TNFR2), que estão presentes em uma grande variedade de células. Quando o TNF- α se liga ao TNFR1, pode haver dois desfechos diferentes, sendo um deles a apoptose da célula e o outro a ativação por

NF- κ B (POSTAL e APPENZELLER, 2011; ZHU et al., 2007). A figura 3 demonstra as funções desempenhadas pelo TNF.

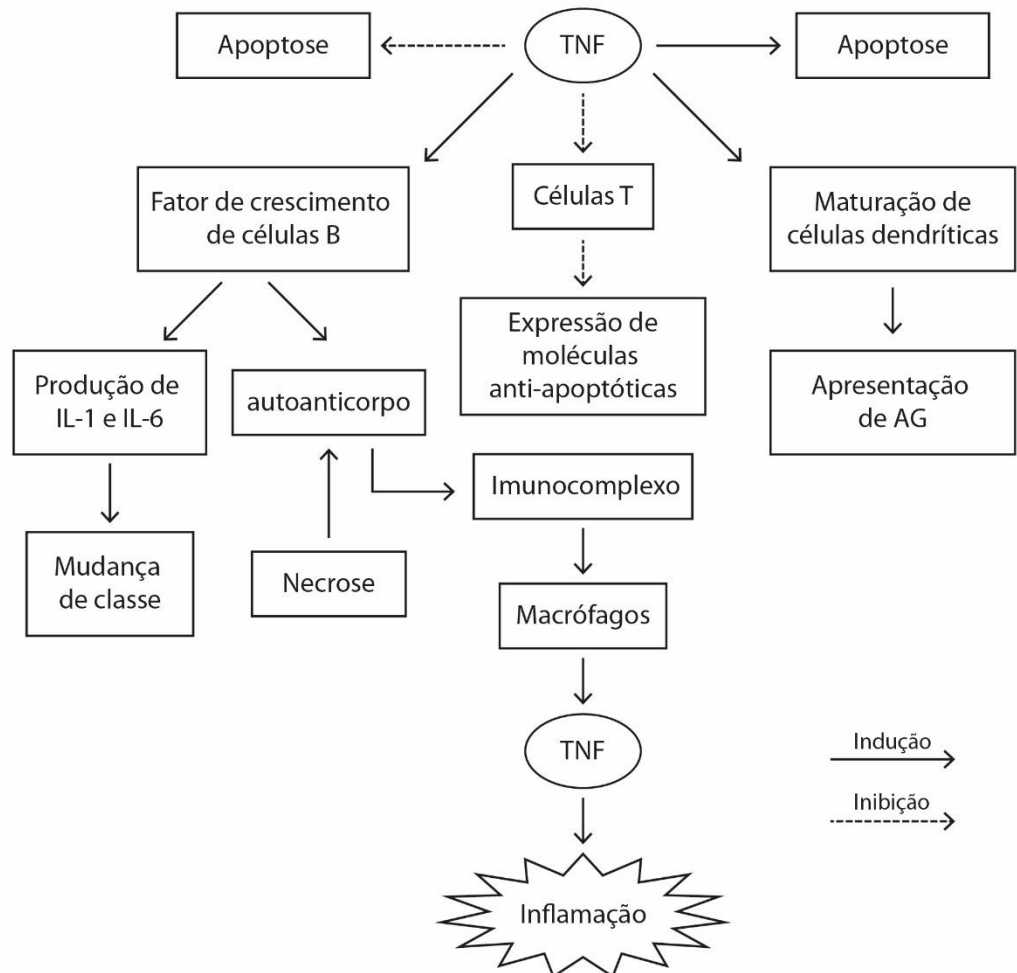


Figura 3: Ações regulatórias do fator de necrose tumoral (TNF- α). IL-1, interleucina 1; IL-6, interleucina 6; Ag, antígeno; TNF, fator de necrose tumoral. Fonte: adaptado de POSTAL e APPENZELLER (2011).

O TNFR2 não possui um domínio de morte, então o Fator 2 Associado ao Receptor de TNF (TRAF-2) liga-se diretamente ao receptor. Quando ligado ao TRAF-2 ativa o NF- κ B, promovendo sobrevivência, proliferação celular e resposta inflamatória. Assim, o TNFR1 pode promover tanto ação apoptótica ou não-apoptótica, já o TNFR2 só está envolvido no efeito não-apoptótico (POSTAL e APPENZELLER, 2011).

Além dos efeitos pró-inflamatórios o TNF- α pode levar a hiporresponsividade de LT e expressão de moléculas antiapoptóticas quando a exposição a ele é

constante e prolongada. Pode inibir LT autorreativos por seleção negativa dos receptores de LT e induzindo apoptose nessas células, ocorrência importante para a manutenção da homeostase imunológica. A apoptose pode ser inibida quando há a ativação do NF- κ B, uma vez que podem ser produzidas por esta via moléculas que inibem a apoptose mediada pela molécula Fas (ZHU et al., 2007).

O TNF- β , também conhecido como linfotóxina alfa (LTA), tem ações semelhantes ao TNF- α e também pode se ligar aos receptores TNFR1 e TNFR2. O TNF- β é uma citocina produzida principalmente por linfócitos B e T ativados. É um potente mediador da resposta imune e inflamatória e está envolvido na regulação de vários processos biológicos, tais como, proliferação celular, diferenciação celular, apoptose, coagulação e neurotransmissão (LADDHA et al., 2013).

1.6. Polimorfismo do *TNF- β* +252 G>A (rs909253)

Mutações podem ocorrer no DNA e acarretar alterações nas suas funções. A mudança mais simples que pode ocorrer é o polimorfismo de um nucleotídeo. É possível outros tipos de mutações como deleções e inserções de um ou mais nucleotídeos, como também inserção de múltiplas sequências repetidas.

Define-se polimorfismo genético como a presença de um alelo variante que existe na forma estável na população em uma frequência que não pode ser explicada por novas mutações (>1%). O tipo mais frequente de polimorfismo é o SNP. O SNP pode ocorrer aproximadamente a cada 300 ou 500 bases do DNA humano.

Quando o SNP ocorre dentro de uma região codificadora, o alelo variante pode levar à troca do códon, ocorrendo a substituição do aminoácido normal por um aminoácido diferente, traduzindo em uma proteína funcionalmente alterada. Comumente os SNPs ocorrem em regiões não codificadoras, podendo alterar a afinidade de ligação dos fatores de transcrição, alterando a taxa de transcrição do gene e conseqüentemente modificando os níveis da proteína resultante (HOLMES et al., 2003). Previamente acreditava-se que mutações nas regiões intrônicas não teriam importância biológica. No entanto, atualmente, reconhece-se que são regiões

importantes na regulação gênica e polimorfismos nessas regiões podem afetar a regulação dos genes, principalmente quando estes polimorfismos ocorrem próximos à fronteiras entre íntron e éxon (WATERER e WUNDERINK, 2003).

O gene *TNF-β* contém 4 exons que codificam um transcrito primário de 2038 nucleotídeos. O *TNF-β* é uma proteína de 171 aminoácidos e é secretado como um polipeptídeo solúvel, que pode formar heterotrímeros com a linfotóxina beta, que estarão ancorados na superfície celular (LADDHA et al., 2013). Um SNP localizado na posição +252 do primeiro íntron do gene do *TNF-β* (rs909253) consiste na troca de uma guanina (alelo mais frequente) por uma adenina (alelo menos frequente) (MESSER et al., 1991). Esse polimorfismo pode ser identificado pelo método de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP) bialélico nas posições 1064 a 1069 do gene pela digestão com a enzima de restrição *Nco1*, que é extraída de *Nocardia corallina*. Podem ser identificados 2 alelos sendo o alelo B1 que possui a guanina na posição + 252 e o alelo B2 quando há presença da adenina (MESSER et al., 1991; MAJETSCHAK et al., 2002; BIJL et al., 2001). Este polimorfismo tem sido associado a diversas doenças autoimunes, tais como LES (GUIMARÃES et al., 2017), esclerose múltipla (KALLAUR et al., 2014b), AR (PANOULA et al., 2008) e síndrome de Sjögren primária (BOLSTAD et al., 2012).

Com o polimorfismo do *TNF-β* +252 G>A, dois alelos são identificados, o alelo B1 (G) e o B2 (A), podendo afetar tanto os níveis plasmáticos de *TNF-β* como também os níveis plasmáticos de *TNF-α*. O alelo B1 está associado com o aumento da expressão de *TNF-β* enquanto o alelo B2 está associado a diminuição desta citocina (MESSER et al., 1991). Também tem sido demonstrado que o alelo B2 em homozigose está associado com aumento na produção de *TNF-α* quando comparado ao genótipo heterozigoto ou com o alelo B1 em homozigose (MAJETSCHAK et al., 1999).

Um estudo na população alemã incluiu 173 pacientes com LES e 192 indivíduos controle e avaliou a frequência dos alelos do *TNFB* +252 G>A e dos haplótipos *HLA-TNFB*. Foi demonstrada maior frequência do alelo B1 em pacientes com LES quando comparados aos controles (63,6% vs 47,1%, respectivamente), enquanto que a frequência do alelo B2 não diferiu entre os grupos. No entanto, a frequência do alelo B1 estava aumentada apenas na presença de outros alelos que

fazem parte do haplótipo *A1, Cw7, B8, TNFB*1, C4A, DE, DR3* e *DQ2*. (BETTINOTTI et al., 1993).

Kim e colaboradores (1996) demonstraram forte associação da nefrite lúpica com o alelo B2 em homozigose (RR=3,4, $p < 0,00001$) em pacientes coreanos. Pacientes que tinham o alelo B2, apresentavam baixa produção de TNF- β . A presença do alelo B1 era mais predominante na população controle quando comparada com o alelo B2. Neste trabalho, não foi observado diferenças na distribuição dos alelos em pacientes com LES. Mas foi demonstrado que além do alelo B2 em homozigose estar associado a nefrite lúpica, a presença do alelo B1 promovia ação protetora.

Em um estudo na população coreana, Lee e colaboradores (1997) analisaram 60 pacientes com LES e 38 indivíduos controles. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção periférica de TNF- α por células mononucleares e associar com o polimorfismo do *TNF- β* em pacientes com LES. Neste ensaio, LT e células mononucleares foram estimuladas por fitohemaglutinina (PHA) a produzirem TNF- α e constatou-se que os pacientes com LES tinham a tendência de secretar menos TNF- α quando comparados aos indivíduos controles. Pacientes com nefrite lúpica apresentavam menores níveis de TNF- α e TNF- β quando comparados com os pacientes que não tinham nefrite. Pacientes que tinham o alelo B2 em homozigose apresentavam menores níveis de TNF- β , quando comparados com aqueles que tinham o alelo B1 em homozigose. Esses resultados sugerem que o alelo B2 em homozigose está associado com baixa produção de TNF- β .

Parks e colaboradores (2004) examinaram, em pacientes lúpicos caucasianos e afro-americanos, a associação do polimorfismo do gene *TNF- α* -308 G/A (rs1800629), -238 G/A (rs361525) e do *TNF- β* +252 G/A (rs909253) com HLA-DR3 e DR2 e polimorfismo da IL-1 α (-889C/T). Foi encontrado que os alelos B2 do *TNF- β* +252 são mais comuns em pacientes caucasianos do que em pacientes afro-americanos. Neste estudo não foi encontrada associação entre o polimorfismo do *TNF- β* +252 G/A com a suscetibilidade ao LES em pacientes caucasianos e afro-americanos.

Ahmed e colaboradores (2014) investigaram na população egípcia (LES=100 e controles saudáveis= 100) a associação do polimorfismo do *TNF- α* -308G/A e do

polimorfismo do *TNF-β* +252 com a suscetibilidade ao LES. Foi demonstrado que pacientes portadores dos genótipos GA+AA do *TNF-α* tinham maior suscetibilidade para o desenvolvimento de serosites (OR: 3,36, IC95% 1,15-9,83), úlceras orais (OR: 6,83, IC95% 32,89), artrites (OR: 3,86, IC95% 1,53-9,83), *rash* malar (OR: 2,87 IC95% 1,05-7,86), e SLEDAI \geq 8 (doença ativa) quando comparados com o genótipo GG. Foi encontrado também que pacientes que carregavam os genótipos GA+GG do *TNF-β* eram mais suscetíveis a artrites (OR: 2,54 IC95% 1,06-6,08) e tinham SLEDAI mais alto do que aqueles que carregavam o genótipo GG. Os resultados sugeriam associação entre o polimorfismo genético do *TNF-α* -308 e do *TNF-β* +252 com a suscetibilidade do LES na população egípcia.

Em 2005, um estudo realizado na população japonesa avaliou a associação do polimorfismo do *TNF-β* +252 com LES em 53 pacientes e 111 indivíduos controles. Anticorpos anti-Sm, anti-URNP, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La e anti-dsDNA também foram avaliados. No grupo LES, 73,8% dos pacientes apresentaram positividade para anti-dsDNA, 36% para anti-URNP, 8,2% para anti-Sm, 36,1% para anti-SSA/Ro e 4,9% para anti-SSB/La. o genótipo B2/B2 foi associado a susceptibilidade ao LES (OR de 2,333, IC 95% 1,194-4,559). Nenhuma associação foi observada entre os autoanticorpos e os alelos do *TNF-β*. O estudo sugere que o alelo B2 pode exercer um papel importante na patogênese do LES (TAKEUCHI et al., 2005).

Santos e colaboradores (2012) avaliaram na população portuguesa a associação entre os polimorfismos do *TNF-α* -308A/G e do *TNF-β* +252 G>A com a suscetibilidade ao LES. Foi avaliada, também, a associação entre manifestações clínicas da doença e os genótipos. Não foi encontrada diferença significativa na frequência genotípica ou alélica do *TNF-α* -308A/G entre os pacientes com LES e os indivíduos controles. A presença de nefrite lúpica (OR: 2,84, IC95% 1,14-7,03) e de anticorpos anti-Sm (OR:3,11, IC95% 1,08-8,94) foram significativamente mais prevalentes em pacientes que possuíam o alelo A do gene do *TNF-α* -308. Também nenhuma associação foi verificada entre o polimorfismo do *TNF-β* e a suscetibilidade ao LES ou a presença de autoanticorpos. No entanto, pacientes que tinham o alelo G do *TNF-β* +252 apresentaram maior ocorrência de nefrite lúpica (OR: 2,90, IC95% 1,12-7,54). Os autores sugerem que os polimorfismos estudados não têm associação com a suscetibilidade ao LES.

Uma metanálise reuniu um total de 19 estudos (13 estudos envolvendo 1346 pacientes com LES e 1951 controles, 6 estudos envolvendo 1079 pacientes com AR e 1057 controles) e investigou a associação do polimorfismo do *TNF-β* +252 G>A com a suscetibilidade ao LES na população asiática. Neste estudo foi demonstrado que o alelo B2, em modelo aditivo, estava associado ao LES (OR: 1,63, IC95% 1,01-2,65). O alelo B2 quando estratificado por etnia acarretava aumento do risco a LES em pacientes asiáticos (OR: 1,91, IC95% 1,44-2,53) (ZHANG et al., 2015).

Umare e colaboradores (2017) investigaram o impacto dos SNPs do *TNF-α* -238G/A; -308G/A e *TNF-β* +252 G>A em pacientes indianos com LES. O estudo consistia 200 pacientes com LES e 201 indivíduos saudáveis. Foram analisados os níveis de *TNF-α* e *TNF-β*, anticorpos antinucleares (ANA), anti-dsDNA, C3 e C4, proteína C reativa (PCR), anticorpos anti-URNP, anti-Sm, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Scl70, anti-PM-Scl, anti-Jo-1, anti-CENP-B, anti-PCNA, antinucleossoma, anti-histona, antiproteínas ribossomais e anti-AMA-M2. Foi encontrado que as frequências de *TNF-α* -308A (OR = 2,3, IC95%: 1,5-3,5, p=0,0001) e *TNF-β* + 252G (OR = 2,1 IC95%: 1,5-3,1, p<0,0001) foram significativamente maiores em pacientes com LES. O haplótipo - AGG foi encontrado com maior frequência nos pacientes do que nos controles (OR = 12,2, IC95%: 2,1-133,3, p=0,0050). Pacientes com genótipos G/A + A/A do *TNF-α* -308 tinham maiores níveis de *TNF-α*, quando comparados a pacientes com o genótipo -308G/G (p<0,0001). Pacientes que tinha genótipos A/G + G/G do *TNF-β* +252, tinham maiores níveis de *TNF-β*, quando comparados com os pacientes que tinha o genótipo A/A. Os genótipos G/A + A/A do *TNF-α* -308 e A/G + G/G do *TNF-β* +252 foram significativamente associados a distúrbios renais e manifestações hematológicas. Pacientes, com LES, com genótipos do G/A+A/A *TNF-α* -308 apresentaram maior prevalência de anticorpos anti-dsDNA (OR=2,7, IC95%:1,2-61, p=0,0131) e anticorpos anti-Sm (OR=3,6, IC95%: 1,2-10,2, p=0,0002). Os autores sugeriram que os polimorfismos do *TNF-α* -308A e *TNF-β* +252G podem ser alelos de risco para susceptibilidade da doença. São associados a níveis séricos mais elevados de *TNF-α* e *TNF-β* e características clínicas discretas concomitantes entre os pacientes indianos com LES.

Guimarães e colaboradores (2017) avaliaram os níveis e perfis de citocinas pró- inflamatórias, Th1, Th2, Th17 e Treg, em 200 pacientes com LES e 196 indivíduos saudáveis, e sua associação com o polimorfismo do *TNF-β* +252 G>A. Os

níveis de IL-6, IL-12, IL-17, IL-10 e IFN- γ foram significativamente maiores em pacientes com LES, enquanto níveis de IL-4 eram menores nesses pacientes. Os perfis Th1/Th2 e Th1+Th17/Th2 foram significativamente maiores em pacientes com LES quando comparado aos indivíduos controle. O genótipo B1/B1 foi associado ao aumento de IL-17 e da razão Th17/Th2. O genótipo B1/B2 foi associado de maiores níveis de IL-4 e IFN- γ .

2. Justificativa

Embora vários estudos tenham avaliado o papel do polimorfismo do *TNF-β* +252 G>A na susceptibilidade ao LES os resultados ainda são bastante contraditórios. Poucos estudos avaliaram a associação deste polimorfismo com a atividade da doença e a presença de autoanticorpos. Este estudo poderá contribuir para o melhor entendimento do envolvimento do polimorfismo do gene do *TNF-β* + 252 G>A na fisiopatologia da doença assim como para propor novos biomarcadores para prognóstico e diagnóstico e alvos terapêuticos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a associação entre o polimorfismo do *TNF-β* +252 G>A (rs909253) com a suscetibilidade do LES, níveis plasmáticos de TNF-α e a presença de autoanticorpos em pacientes com doença ativa.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a frequência do polimorfismo genético do *TNF-β* +252 G/A em pacientes com LES e em indivíduos controle.
- Avaliar a associação entre o polimorfismo genético do *TNF-β* +252 G/A e a suscetibilidade ao LES
- Avaliar a associação entre o polimorfismo genético do *TNF-β* +252 G/A e os níveis plasmáticos de TNF-α e séricos de autoanticorpos.
- Avaliar a associação entre o polimorfismo genético do *TNF-β* +252 G/A e a atividade da doença avaliada pelo SLEDAI.
- Verificar quais fatores estão associados a atividade da doença de acordo com os genótipos e a presença de autoanticorpos

4. Sujeitos e Métodos

4.1. População, Amostra e Delineamento

Este é um estudo caso-controle onde foram selecionados 421 indivíduos para participar neste estudo caso-controle: 195 pacientes com LES atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e 226 voluntários controles do Hospital Universitário da UEL. O LES foi diagnosticado utilizando-se os critérios revisados do *American College of Rheumatology* (ACR) (HOCHBERG, 1997). A atividade da doença foi determinada utilizando-se o escore SLEDAI (BOMBARDIER et al., 1992).

Pacientes com SLEDAI ≥ 6 foram classificados com doença ativa (LOZOVOY et al., 2011). Nefrite foi diagnosticada com embasamento na proteinúria ($\geq 0,5\text{g}/24\text{h}$), e/ou hematúria, ou achado patológico no sedimento urinário com ou sem aumento da creatinina (SUI et al., 2013). No entanto, nenhum paciente apresentava nefrite lúpica em atividade.

Os participantes do estudo não apresentavam doenças cardíacas, renais, tireoidianas, hepáticas, gastrointestinais, oncológicas ou outras doença autoimunes, nenhuma evidencia clínica de infecção e não recebiam terapia hormonal.

4.2. Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL (CAAE= 0186512.0.0000.5231).

A pesquisa foi conduzida conforme todas as normas estabelecidas de experimentos em humanos e um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos incluídos no estudo (Apêndices 1 e 2). Todos os

procedimentos obrigatórios de saúde e de segurança de laboratório foram cumpridos.

4.3. Dados Demográficos, Clínicos e Epidemiológicos

Os dados sobre o histórico médico foram obtidos na avaliação clínica realizada por médicos reumatologistas. Informações como duração da doença, utilização de medicamentos, anti-inflamatórios não esteroides, corticosteroides, antimaláricos, contraceptivos orais, medicamentos anti-hipertensivos foram registrados para cada paciente.

4.4. Medidas Antropométricas

O peso corporal foi avaliado com aproximação de 0,1 kg utilizando uma balança eletrônica e com os indivíduos utilizando roupas leves e sem sapatos, no período da manhã. A altura foi medida com precisão de 0,1 cm, utilizando-se um estadiômetro. O IMC foi calculado com peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado.

4.5. Exames Laboratoriais

Amostras de sangue periférico foram obtidas dos indivíduos participantes do projeto, por punção venosa, com tubos de coleta a vácuo, sem e com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os leucócitos foram separados por centrifugação a 2.000 rotações por minuto (r.p.m.) durante dez minutos à temperatura ambiente e o *buffy-coat* foi congelado e mantido em *freezer* -20° C até o momento do processamento.

O plasma e o soro foram aliquotados, congelados e mantidos em *freezer* a -80°C até o momento do processamento. Todas as amostras foram identificadas em ordem numérica sequencial.

4.6. Avaliação do Polimorfismo Genético do *TNF-β +252 A/G*

4.6.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído com kit de extração de DNA com coluna de resina (Biopur, eBiometrix Diagnóstica, Curitiba, Paraná) de acordo com instruções do fabricante, com algumas modificações, como o volume de *buffy-coat* utilizado (200µL) e a temperatura do tampão de eluição (70°C). A presença e integridade do DNA extraído foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Barker,2002), aplicando-se então 5µL da amostra de DNA extraído e 5µL do corante xileno cianol. A eletroforese foi realizada a 100 V, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x (Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carisbad, CA, USA). Após realizada corrida de 45-60 minutos, o gel foi submerso em uma cuba com tampão TAE 1x (Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carisbad, CA, USA) contendo brometo de etídio (20mg/ml) por 20 minutos e revelado por transiluminador de UV (Vilber Lourmat™, Marne-la-Vallée, France). Foi incluído um controle de DNA de concentração de aproximadamente 100 ng/µL em cada eletroforese realizada para análise comparativa com o DNA das amostras do estudo.

4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Um fragmento de 782 pares de base (pb) do gene do *TNF-β* foi amplificado de acordo com dados descritos na literatura (DELONGUI et al., 2011; MAJETSCHAK. et al., 2002; MAJETSCHAK et al., 1999) com algumas modificações. Os iniciadores (*primers*) foram desenhados de acordo com *GenBank* número X02911 (MAJETSCHAK et al., 1999). O *primer 1* (*TNFB1 sense*) é formado pela sequência 5'

CCG TGC TTC GTG CTT TGG GAC TA 3' e o *primer 2* (*TNFB2 antisense*) pela sequência 5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 2,5mM de cada *primer*, 50mM de MgCl₂, 1,25mM de dNTP (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,25U da enzima DNA polimerase recombinante diluída em tampão (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e 2µL da amostra de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador PCR Sprint-Thermo Hybaid® (Biosystems, Barcelona, Espanha), com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido por 37 ciclos de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 67°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Foi utilizado um controle negativo, que não tinha amostra de DNA, e um positivo em cada bateria de PCR. A amplificação do gene do TNF-β foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando um marcador *ladder* de 100 pb (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), corado com brometo de etídio e visualizado com a presença de UV pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil).

4.6.3 Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)

O produto final da PCR foi submetido à digestão pela enzima *Nco1* recombinante (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). 10 µL do produto de PCR foram completamente digeridos com 0,3 µL de enzima *Nco1* 10 U/µL por 4 horas a 37°C. Os fragmentos provenientes da digestão foram analisados pelo método de *RFLP* em eletroforese com gel de agarose a 3%, 70 V por 70 minutos. Depois da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio, conforme dados descritos na literatura (DELONGUI et al., 2011; MAJETSCHAK et al., 2002; MAJETSCHAK et al., 1999). O alelo *TNFB1* apresenta dois fragmentos sendo um deles contendo 196 bp e o outro de 586 bp (presença do sitio de restrição em ambos os alelos). O alelo *TNFB2* resulta em apenas um fragmento de 782 bp (ausência do sitio de restrição em ambos os alelos). O genótipo heterozigoto *TNFB1/TNFB2* resulta em 3

fragmentos, com 782 bp, 586 bp e 196 bp. As imagens foram capturadas e armazenadas pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus, Biotechnology, Cotia, Brasil).

4.7 Dosagem dos Níveis Plasmáticos de TNF- α

Os níveis plasmáticos de TNF- α foram avaliados pelo método de enzimmunoensaio (ELISA) quantitativo, utilizando-se reagentes do *Kit Human TNF- α* (eBioscienceTM, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.8 Pesquisa de Autoanticorpos

A pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA) foi realizada por imunofluorescência indireta (IFI), utilizando células HEp2 como substrato (IFI-ANA-HEp2-IgG, VIRO-IMMUN LaborDiagnostika, GmbH, Oberursel, Alemanha) e foi considerado positivo quando ANA $\geq 1/80$. Anticorpos anti-dsDNA, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Sm e anti-URNP foram determinados utilizando eELISA, (Orgentec Diagnostika, GmbH, Alemanha). Os resultados foram considerados positivos quando superiores a 20UI/mL.

Todos os resultados positivos para anti-dsDNA no teste de ELISA foram confirmados por IFI com *Crithidia lucillae* como substrato e os resultados foram considerados positivos quando os títulos foram iguais ou superiores a 1/10.

4.9 Dosagem de C3 e C4

Os níveis séricos de C3 e C4 foram mensurados pela metodologia de turbidimetria automatizada no equipamento C8000 (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park IL, USA).

Valores de referência de C3:

- Feminino: 83 a 193 mg/dL
- Masculino: 82 a 185 mg/dL

Valores de referência de C4:

- Feminino: 15 a 57 mg/dL
- Masculino: 15 a 53 mg/dL

4.10 Análise Estatística

Foram utilizadas análises de tabelas de contingência (teste χ^2) para verificar as associações entre variáveis categóricas e grupos de diagnóstico.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. A transformação logarítmica (Ln) de dados contínuos foi utilizada nas análises quando as variáveis não foram normalmente distribuídas ou quando houve heterogeneidade de variância (conforme avaliado com o teste Levene). Para avaliar diferenças em variáveis contínuas entre grupos foi utilizado o teste de análises de variância (ANOVAs).

e os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (\pm SEM). As variáveis categóricas avaliadas pelo teste de qui-quadrado ou Exato de Fisher, conforme apropriado e os dados foram expressos como número absoluto (n) e porcentagem (%). A associação entre biomarcadores e LES foi avaliada usando análise de regressão logística binária controlada para covariáveis que poderiam confundir a associação de interesse. Para delinear quais variáveis clínicas e demográficas e quais os anticorpos contribuíram para a atividade da doença, foram realizadas 3 regressões logísticas binárias automáticas diferentes (1 # positivo anti-DNA, 2 # positivo anti-Sm e 3 # positivo anti-DNA/anti-Sm) de acordo com o polimorfismo do *TNF- β* +252 A> G. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o IBM SPSS windows versão 24. Os testes foram bicaudais e um nível alfa de 0,05 indica resultados estatisticamente significativos.

5. Resultados

Os resultados obtidos nesta dissertação foram apresentados e discutidos em um artigo científico intitulado: “***TNF-β +252 G>A (rs909253) POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH ACTIVE SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS***” que foi submetido a ao periódico *Clinical and Experimental Medicine* com fator de impacto de 2.787 (Qualis A2).

TNF-β +252 G>A (rs909253) POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH AUTOANTIBODIES PRESENCE IN PATIENTS WITH ACTIVE SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Bruno Alexandre Sekiguchi¹, Daniela Frizon Alfieri¹, Naiara Lourenço Mari¹, Marcell Alysson Batisti Lozovoy², Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda³, Neide Tomimura Costa⁴, Francieli Delongui¹, Nicole Perugini Stadlober¹, Edna Maria Vissoci Reiche², Isaias Dichi⁴, Andréa Name Colado Simão²

- 1 Research Laboratory in Applied Immunology– University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
- 2 Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
- 3 Department of Rheumatology – PUC, Pontifícia Universidade Católica, Londrina, Paraná,
- 4 Department of Internal Medicine – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

*Corresponding author: Andrea Name Colado Simão, PhD. Department of Clinical Pathology. Robert Koch Avenue nº 60 Bairro Cervejaria, University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440 Tel: (55) 43 3371 2321
e-mail: deianame@yahoo.com.br

ABSTRACT

TNF- β +252 G>A (rs909253) polymorphism has been associated with a risk of development of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and change in *TNF- α* plasma levels. The aim of the present study was to evaluate the association between the *TNF- β* +252 G>A polymorphism with the susceptibility for SLE, *TNF- α* levels, and presence of autoantibodies in patients with active SLE. This cross-sectional study included 195 patients with SLE and 226 controls. The polymorphism was studied by using polymerase chain reaction-restriction fragment length (PCR-RFLP). Active disease was categorized when SLEDAI ≥ 6 . Serum *TNF- α* levels and autoantibodies were determined by enzyme linked immunosorbent assay. No differences were observed among patients and controls in allele frequency and genotype distribution when evaluated in an additive as well as in a dominant model. Patients with B2/B2 genotype showed higher *TNF- α* levels ($p=0.040$). However, after correction to age, sex, BMI, treatment and disease activity, *TNF- α* levels did not remain associated with this genotype. Only patients carrying B2/B2 genotype with active disease showed higher levels of anti-dsDNA and anti-Smith and low levels of C3. Moreover, patients with B2/B2 genotype showed an increase adds to have active disease with the presence of anti-dsDNA (OR: 4,50, 95%CI: 1.61-12.54, $p=0.004$), anti-Smith (OR: 16.87, 95%CI: 1.97-44.38, $p=0.010$) or both (OR: 12.23, 95%CI: 1.40-46.86, $p=0.024$). In conclusion, *TNF- β* +252 G>A polymorphism was not associated with SLE susceptibility, disease activity, plasma *TNF- α* levels and autoantibodies levels in Brazilian patients. However, the interaction between active disease and B2/B2 genotype are associated with presence of autoantibodies.

Keywords: Systemic lupus erythematosus, autoantibodies, active disease, *TNF- β* +252 A>G polymorphism, (rs909253)

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by autoantibody production and immune complex formation leading to intense inflammation and multiple organ damage [1].

Two meta-analyses identified many linked regions that may harbor the SLE susceptibility genes, and demonstrated significant linkages in the intervals of 6p21-6p22 and SLE [2,3]. Moreover, this region where HLA genes are located contains not only the HLA class I, II and III genes, but also the genes that encode complement components (C4), tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF- β (also known as lymphotoxin- α) [4]. Several studies suggest that HLA-DR molecules may have an increased association with the production and specificity of autoantibodies rather than with the disease itself [5-7]. Moreover, HLA-DR3 showed a strong linkage disequilibrium with TNF- β polymorphism [8].

TNF- β polymorphism (rs909253) at the position +252 within the first intron, consisting of a guanine base, characterizes the B1 allele, whereas an adenine base characterizes the B2 allele +252 G>A. This single nucleotide polymorphism (SNP) that has been associated with changes in TNF- α plasma levels [9] and with failure to regulate TNF- α synthesis, at sites of immunological injury, leads to chronic activation of innate immune cells and chronic inflammatory responses [10] that potentially lead to tissue damage [11]. In addition, this SNP has been associated with a risk of development of several autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis [12], multiple sclerosis [13], scleroderma [14], and primary Sjögren's syndrome [15], and SLE [16]. The role of this polymorphism on the SLE susceptibility has been extensively investigated, although published studies provided controversial results; while some studies revealed association with SLE [8, 16-18], in others this association was not found [19, 20].

The relationship between the presence of SNP with SLE disease activity [16,19], TNF- α levels [19], and autoantibodies [18-20] has been studied, however the results have been controversial. Recently, we demonstrated that B1/B1 genotype is accompanied by increased IL-17 and Th17/Th2 ratio, while B1/B2 genotype is accompanied by higher IL-4 and IFN γ values [21]. Thus, the hypothesis the present study is that B2 allele could be associated with disease activity and autoantibodies production.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the association between the *TNF- β* +252 G>A polymorphism with the susceptibility for SLE, TNF- α levels, and presence of autoantibodies in patients with active SLE.

SUBJECTS AND METHODS

This cross-sectional study included 195 patients with SLE and 226 subjects (control group) with no family history of autoimmune disease and from the same geographic area. The patients were recruited at the Rheumatology Ambulatory of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. SLE was diagnosed using the American College of Rheumatology (ACR) criteria (1997) and the disease activity was determined using SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score [22]. Patients with SLEDAI ≥ 6 were classified as having active disease [23]. History of nephritis was diagnosed based on the presence of proteinuria ($\geq 0.5\text{g}/24\text{h}$), and/or hematuria, or pathological findings in the urine sediment, with or without increases in creatinine levels [24]. None patient had active lupus nephritis.

Information about lifestyle and medical history were obtained at clinical evaluation. None of the participants in the study presented heart, renal, thyroid, hepatic, gastrointestinal, oncological or other autoimmune diseases, and none had a clinically evident infection. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (cm) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian (Asiatic, Black, and Afro-Brazilian) [25].

This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki. The Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil approved all procedures involving human subjects. Written informed consent was obtained from all patients (CAAE: 0186512.0.0000.5231).

Immunological Biomarkers

Peripheral blood samples were collected with EDTA as anti-coagulant, and without anticoagulant, to obtain the buffy coat and plasma, and serum, respectively, that were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezer until used.

The C3 and C4 serum levels were measured by immunoturbidimetry using the C 8000 equipment (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park IL, USA). The serum levels of anti-dsDNA, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-Smith, anti-URNP, and anti-nucleosome were determined by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Germany). The results were considered positives when the levels were higher than 20 UI/mL. All positive results for anti-dsDNA were confirmed using immunofluorescence with *Crithidia lucilliae* kinetoplast assay. TNF- α plasma levels were evaluated using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA).

TNF- β +252 G>A Genetic Polymorphism (rs909253)

The genomic DNA was extracted from the buffy coat using a commercial DNA extraction kit (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's instructions. A 782 base-pair (bp) fragment of the *TNF- β* was amplified using polymerase chain reaction (PCR) as previously reported [26]. PCR products were completely digested with *Nco1* enzyme (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 4 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The *TNF- β +252 A>G* genotypes were identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length (RFLP) analysis in a 3 % agarose gel electrophoresis (70 V, 70 min) and stained with ethidium bromide. The B1 allele includes a restriction site for *Nco1* and results in 196- and 586-bp fragments after digestion, and the B2 allele (lacking the restriction site for *Nco1*) results in a fragment with 782 bp. The heterozygous genotype B1/B2 results three fragments (782, 586, and 196 bp).

Statistics

Analyses of contingency tables (χ^2 test) were employed to check the associations between categorical variables and diagnostic groups. Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and continuous variables were expressed as mean \pm error standard of main (SEM). The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformation of continuous data was used in the analysis when the variables were not normally distributed or when there was heterogeneity of variance (as assessed with the Levene test). We assessed the differences in continuous variables between groups using analyses of variance (ANOVAs). The association between biomarkers and SLE was evaluated using binary logistic regression analysis controlled for covariates that may confound the association of interest. To delineate which clinical and demographic variables and which antibodies contributed to the disease activity, we carried out 3 different automatic stepwise binary logistic regression (1# positive anti-DNA, 2# positive anti-Sm and 3# positive anti-DNA/anti-Sm) according *TNF- β* +252 G>A polymorphism. All statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 24. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results.

RESULTS

Clinical and immunological parameters are shown in table 1. Of 195 participating patients, the mean of disease duration was 10.13 years, 54 (28.4%) patients had active disease (SLEDAI \geq 6), and 71 (48.3%) history of lupus nephritis; 136 (73.0%) patients had antinuclear antibodies (ANA), anti-nucleosome antibodies were detected in 92 (70.8%) patients, anti-URNP in 55 (44.7%), anti-dsDNA in 86 (45.5%), anti-SSA/Ro in 47 (40.9%), anti-Sm in 31 (24.4%), anti-SSB/La in 15 (11.6%) patients. Regarding treatment, 170 (95.0%) patients used prednisone, 141 (75.4%) antimalarial, 81 (43.3%) used other immunosuppressive drugs and 42 (22.5%) mycophenolate.

Table 2 shows the characteristics of patients with SLE and controls. The results of ANOVAs showed that patients and controls did not differ according to age ($p=0.139$) and sex ($p=0.167$). However, patients had higher BMI ($p<0.001$) and higher frequency of non-Caucasian ($p<0.001$) than controls. In addition, SLE patients presented higher TNF- α levels than controls ($p=0.005$). After p value correction by ethnicity and BMI, TNF- α level remained significantly increased in SLE patients ($p=0.019$) (Table 2).

The genotype distribution of *TNF- β* +252 A>G polymorphism in controls and patients were consistent with those expected from the Hardy–Weinberg equilibrium ($p>0.05$). In SLE patients, we identified 47.7% B2/B2, 45.1% B1/B2, and 7.2% B1/B1, resulting in allele frequencies of 70.5% and 29.5% for B2 and B1 alleles, respectively. In controls, we identified 40.7% B2/B2, 50.0% B1/B2, and 9.3% B1/B1, resulting in allele frequencies of 66.0% and 34.0% for B2 and B1 alleles, respectively. No differences were observed in allele frequency and genotype distribution when evaluated in an additive or in a recessive model among patients and controls before and after correction by ethnicity and BMI ($p>0.05$) (Table 2). The recessive model (B2/B2 vs B1/B2+B1/B1) allows examining the association between B2 allele at homozygote and biomarkers; therefore, this model was used for sequential analysis.

Table 3 shows the characteristics of SLE patients according the *TNF- β* +252 G>A polymorphism. In univariate analyses, both groups did not differ in relation to sex ($p=0.190$), ethnicity ($p=0.988$), age ($p=0.412$), BMI ($p=0.983$), disease duration ($p=0.839$), activity disease evaluated by SLEDAI ($p=0.129$), history of nephritis ($p=0.815$), C3 ($p=0.167$) and C4 ($p=0.334$) levels, and therapy ($p>0.05$). Regarding autoantibodies, the groups did not differ in positivity of ANA ($p=0.537$) and anti-URNP ($p=0.140$), and positivity and levels of anti-dsDNA ($p=0.921$, $p=0.921$), anti-RO ($p=0.384$, $p=0.309$), anti-LA ($p=0.142$, $p=0.128$), anti-SM ($p=0.216$, $p=0.301$), and anti-nucleosome ($p=0.962$, $p=0.551$), respectively. However, patients with B2/B2 genotype showed higher TNF- α levels ($p=0.040$) and lower anti-URNP levels ($p=0.037$) than patients carrying B1 allele. Additionally, multivariate binary logistic regression was performed and neither TNF- α nor anti-URNP was independently associated with the presence of B2 allele (data not shown).

Anti-dsDNA, anti-Smith, anti-URNP, C3 and C4 levels were analyzed in patients according to the presence of disease activity (SLEDAI ≥ 6) and *TNF- β* (+252

A>G) polymorphism (Figure 1). Patients with disease active and B2/B2 genotype showed higher anti-dsDNA ($p=0.021$), anti-Smith ($p=0.015$), and lower C4 levels ($p=0.042$) levels than patients with SLEDAI<6, independently of sex, age, BMI, disease duration, treatment and nephritis. There were no differences in both groups when patients with B1/B2+B2/B2 genotypes was evaluated ($p>0.05$). The others autoantibodies (anti-Ro, anti-La, anti-URNP, and anti-nucleosome), and TNF- α levels did not differ according disease activity with presence of *TNF- β* (+252 A>G) polymorphism ($p>0.05$) (data not shown).

Furthermore, to delineate the effect the autoantibodies and the most important variables that affect disease activity according to genotype, we have carried out three automatic stepwise binary logistic regression analyses with disease activity as dependent variable (SLEDAI<6 as reference group) and the demographic (e.g. age, sex, BMI) and clinical (therapy, disease duration, history of nephritis) data as explanatory variables. In the first regression, the positivity of anti-dsDNA ($p=0.004$, OR: 4.50, 95% CI 1.61-12.54) was associated with active disease only in patients with B2/B2 genotype ($p<0.001$, Nagelkerke=0.151; 65.4.0% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 60.0% and a specificity of 75.0%). In the second regression, the positivity of anti-Smith ($p<0.010$, OR: 16.87, 95% IC 1.97-44.38) was associated with active disease only in patients with B2/B2 genotype ($p<0.001$, Nagelkerke=0.252; 68.5% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 96.4 % and a specificity of 38.5%). In the third model, the concomitant presence of anti-dsDNA and anti-Sm ($p=0.024$, OR 12.23, 95% CI 1.40-46.86) was associated with active disease only in patients with B2/B2 genotype ($p<0.001$, Nagelkerke=0.191; 65.4.% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 96.3% and a specificity of 32.0%). In addition, in patients with B1 allele, presence of autoantibodies did not contribute to disease activity.

DISCUSSION

The main findings of the present study were that the B2 allele of *TNF-β* +252 G>A polymorphism, in heterozygosity, homozygosity or dominant model, was not associated with SLE susceptibility, TNF- α plasma levels, disease activity, and presence of autoantibodies. However, when the interaction between disease activity and polymorphism was evaluated, only patients carrying B2/B2 genotype with active disease (SLEDAI ≥ 6) showed increased anti-dsDNA and anti-Smith levels, and decreased C4 levels, independently of clinical and demographic data. Moreover, patients with B2/B2 genotype with positivity of anti-dsDNA, anti-Sm or both showed increased odds ratio (OR) to have active disease of 4.50, 16.87 and 12.23-fold, respectively.

Data about association between SLE susceptibility and *TNF-β* (+252 G>A) polymorphism have been conflicting in different populations. Previous studies demonstrated that B1 allele was associated with SLE in Germany [8, 27], India [18], and Egypt [16]. On the other hand, the B2 allele in additive and allelic model was associated with SLE susceptibility in Asian population [20, 28]. In addition, a meta-analysis performed by Zhang and colleagues (2015) showed that B2 allele and additive model were significantly associated with SLE [29]. However, our result agrees with studies carried out in Portuguese [19], Canadian [30] and American [17] population that showed absence of association of this SNP with SLE susceptibility. The difference between previous results and our study could be explained by the large degrees of ethnic differences which compose the Brazilian population [31] that is originated mainly from Europeans, Africans, Amerindians, Levantines and from East Asia.

Although *TNF-β* +252 G>A polymorphism has been extensively investigated in SLE susceptibility, TNF- α levels was scarcely studied. Our data agree with previous studies [19,32] that did not demonstrate any association with this cytokine. Despite in univariate analysis we showed that higher serum TNF- α levels were associated with B2/B2 genotype, these factors did not remain associated after correction of confounding factors.

The association between *TNF-β* +252 G>A polymorphism with activity disease and clinical manifestation are controversial. While higher SLEDAI score was found in patients with B1/B2+B1/B1 genotypes [19], Ahmed et al (2014) found no association

with disease activity. Regarding the clinical manifestations, B1 allele was associated with arthritis [16,19] and hematological manifestations [16]. On the other hand, B2/B2 genotype was strongly associated with development of nephritis [27,31,33]. In the present study, we also could not demonstrate association between *TNF-β* +252 G>A polymorphism, disease activity (SLEDAI), and history of nephritis. In addition, anti-dsDNA, anti-Sm, and complement (C3 and C4) levels did not differ according *TNF-β* polymorphism in SLE patients. Our data agree with previous studies, which did not find any association between *TNF-β* +252 A>G polymorphism and autoantibodies in SLE patients [16, 18-20].

Of note, in the present study, patients with active disease (SLEDAI \geq 6) and B2/B2 genotype showed positivity and increased anti-dsDNA and anti-Sm levels, independently of demographic and clinical biomarkers. In addition, besides the production of autoantibodies, reduced C4 levels were found in patients with active disease in the presence of the B2/B2 genotype. In a previous study, our group showed that B1/B1 genotype is accompanied by increased IL-17 and Th17/Th2 ratio, while B1/B2 genotype is accompanied by higher IL-4 and IFN γ values in SLE patients. The data of the present study reinforce the hypothesis that B2 allele could be involved with autoantibodies production by association with Th2 response. In addition, the dominant pathway for complement activation in SLE is the classical pathway triggered by the interaction of C1q with antigen-antibody complexes and aggregated immunoglobulins. In this classical pathway, complement protein levels are reduced in association with active disease, especially C1, C4 and C2 levels [34]. The findings of increased autoantibodies and decreased C4 levels in the current study seems to corroborate the aforementioned classical pathway.

Furthermore, in the present study, we verified by automatic binary logistic regression the most important variables which contributed to disease activity (SLEDAI \geq 6) according with the genotype. Our data demonstrated that the presence of anti-dsDNA and anti-Sm or both could predict the activity disease in patients with B2/B2 genotype but not with B1 allele patients. Sun et al (2000) demonstrated that presence of anti-dsDNA *in vitro* may have a dual effect: to enhance the release of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8 and TNF- α) and to polarize the immune reaction towards T helper 2 (Th2) response [35]. Therefore, autoantibodies may form immune complex and subsequently increase pro-inflammatory cytokines [36] and activity disease.

The following limitations have to be considered in the present study. Firstly, our patients showed low disease activity measured by SLEDAI. Secondly, the study design cannot infer causality between presence of autoantibodies and disease activity. However, this study also has several strengths. First, to our knowledge, this is the first study to evaluate *TNF-β* polymorphism with interaction of autoantibodies and disease in Brazilian population. Secondly, this study combines a multivariate statistical approach; all results were controlled for possible effects of background variables including age, sex, ethnicity, BMI, treatment, and history of nephritis.

In conclusion, our findings indicate that the *TNF-β* +252 G>A polymorphism was not associated with SLE susceptibility, disease activity, TNF-α and autoantibodies levels in Brazilian patients. However, patients with B2/B2 genotype showed an increase adds to have active disease with the presence of anti-dsDNA, anti-Smith or both.

Acknowledgements

This study was supported by the National Council of Brazilian Research-CNPq and by Araucária Foundation from the state of Paraná. We thank the University Hospital of State University of Londrina for technical and administrative supports.

Compliance with ethical standards

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent

All the participants included in this study provided written informed consent.

REFERENCES

1. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Path.* 2003 Jul;56(7):481 - 90.
2. Forabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2006 Oct 14;7(7):609-14.
3. Lee YH, Nath SK. Systemic lupus erythematosus susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis. *Hum Genet* 2005 Dec 6;118(3-4): 434-43.
4. Sestak AL, Nath SK, Sawalha AH, Harley JB. Current status of lupus genetics. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(3):1-9.
5. Graham RR, Ortmann W, Rodine P, Espe K, Langefeld C, Lange E, et al. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *Eur J Hum Genet.* 2007 Aug 4;15(8):823-30.
6. Morris DL, Fernando MM, Taylor KE, Chung SA, Nititham J, Alarcón-Riquelme ME, et al. MHC associations with clinical and autoantibody manifestations in European SLE. *Genes Immun.* 2014 Apr;15(4):210-7.
7. Smolen JS, Klippel JH, Penner E, Reichlin M, Steinberg AD, Chused TM, et al. HLA-DR antigens in systemic lupus erythematosus: association with specificity of autoantibody responses to nuclear antigens. *Ann Rheum Dis.* 1987 Jun;46(6):457-62.
8. Schotte H, Willeke P, Tidow N, Domschke W, Assmann G, Gaubitz M, et al. Extended haplotype analysis reveals an association of TNF polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus beyond HLA-DR3. *Scand J Rheumatol.* 2005 Mar-Apr;34(2):114-21.
9. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honald G, Blömer K, Page GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med.* 1991 Jan 1;174(1):209-19.

10. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. The function of tumor necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis.* 1999 Nov;58Suppl 1:I32-9.
11. Aringer M, Smolen JS. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2008 Jan 23;10(1):202.
12. Panoulas VF, Nikas SN, Smith JP, Douglas KM, Nightingale P, Milionis HJ, et al. Lymphotoxin 252A>G polymorphism is common and associates with myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Nov 1;67(11):1550-6.
13. Kallaur AP, Oliveira SR, Simão ANC, de Almeida ER, Morimoto HK, Lopes J, et al. Tumor necrosis factor beta (TNF- β) NcoI polymorphism is associated with multiple sclerosis in Caucasian patients from Southern Brazil independently from HLA-DRB1. *J Mol Neurosci.* 2014 Jun;53(2):211-21.
14. Pandey JP, Takeuchi F. TNF- α and TNF- β gene polymorphisms in systemic sclerosis. *Hum Immunol.* 1999 Nov;60(11):1128-30.
15. Bolstad AI, Le Hellard S, Kristjansdottir G, Vasaitis L, Kvarnström M, Sjöwall C, et al. Association between genetic variants in the tumour necrosis factor/lymphotoxin α /lymphotoxin β locus and primary Sjögren's syndrome in Scandinavian samples. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jun;71(6):981-88.
16. Ahmed HH, Taha FM, Darweesh Hel-S, Morsi HM. Association between TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms and systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep.* 2014 Apr 14;41(4):2029-36.
17. Parks CG, Pandey JP, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, et al. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF- β in a population-based study of systemic lupus erythematosus: Associations and interaction with the interleukin-1 α -889 C/T polymorphism. *Hum Immunol.* 2004 Jun;65(6):622-31.
18. Umare VD, Pradhan VD, Rajadhyaksha AG, Patwardhan MM, Ghosh K, Nadkarni AH. Impact of TNF- α and LT α gene polymorphisms on genetic susceptibility in Indian SLE patients. *Hum Immunol.* 2017 Feb;78(2):201-08.

19. Santos MJ, Carmona-Fernandes D, Caetano-Lopes J, Perpétuo IP, Vidal B, Capela S, et al. TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2012 Aug 5;32(8):2239-44.
20. Takeuchi F, Nakano K, Nabeta H, Hong GH, Kawasugi K, Mori M, et al. Genetic contribution of the tumour necrosis factor (TNF) B + 252*2/2 genotype, but not the TNFa,b microsatellite alleles, to systemic lupus erythematosus in Japanese patients. *Int J Immunogenet.* 2005 Jun;32(3):173-8.
21. Guimarães PM, Scavuzzi BM, Stadtlober NP, Franchi Santos LFDR, Lozovoy MAB, Iriyoda TMV, et al. Cytokines in systemic lupus erythematosus: far beyond Th1/Th2 dualism lupus: cytokine profiles. *Immunol Cell Biol.* 2017 Oct;95(9):824-31.
22. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725.
23. Lozovoy, MA, Simão AN, Hohmann MS, Simão TN, Barbosa DS, Morimoto HK, et al. Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome. *Lupus.* 2011 Nov 25;20(13):1356-64.
24. Sui M, Lin Q, Xu Z, Han X, Xie R, Jia X, et al. Simultaneous Positivity for Anti-DNA, Anti-Nucleosome and Anti-Histone Antibodies is a Marker for More Severe Lupus Nephritis. *J Clin Immunol.* 2013 Feb 26;33(2):378-87.
25. Brazil. Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe [document on the Internet]. Brazilian Institute of Geography and Statistics; 2011 [cited 2018 feb 8]. Available from: http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao/default%7B_%7Dcaracteristicas%7B_%7Dda%7B_%7Dpopulacao.shtm.
26. Delongui F, Carvalho Grion CM, Ehara Watanab MA, Morimoto HK, Bonametti AM, Maeda Oda JM, et al. Association of tumor necrosis factor β genetic polymorphism and sepsis susceptibility. *Exp Ther Med.* 2011 Mar;2(2):349-56

27. Bettinotti MP, Hartung K, Deicher H, Messer G, Keller E, Weiss EH, et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor beta gene in systemic lupus erythematosus: TNFB-MHC haplotypes. *Immunogenetics*. 1993;37(6):449-54.
28. Kim TG, Kim HY, Lee SH, Cho CS, Park SH, Choi HB, et al. Systemic Lupus Erythematosus with Nephritis Is Strongly Associated with the TNFB*2 Homozygote in the Korean Population. *Hum Immunol*. 1996 Mar;46(1):10-7.
29. Zhang C, Zhao MQ, Liu J, Huang Q, Li P, Ni J, et al. Association of lymphotoxin alpha polymorphism with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis*. 2015 May;18(4):398-407.
30. Goldstein R, Sengar DP. Comparative studies of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1993 Aug;36(8):1121-7.
31. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011 Feb 16;6(2):e17063.
32. Lee SH, Park SH, Min JK, Kim SI, Yoo WH, Hong YS, et al. Decreased tumour necrosis factor-beta production in TNFB*2 homozygote: an important predisposing factor of lupus nephritis in Koreans. *Lupus*. 1997;6(7):603-9.
33. Kim HY, Lee SH, Yang HI, Park SH, Cho CS, Kim TG, et al. TNFB gene polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus in Korean. *Korean J Intern Med*. 1995 Jul;10(2):130-6.
34. Walport MJ. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S279-93.
35. Sun KH, Yu CL, Tang SJ, Sun GH. Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expression and release of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis. *Immunology*. 2000 Mar;99(3):352-60.
36. Thanadetsuntorn C, Ngamjanyaporn P, Setthaudom C, Hodge K, Saengpiya N, Pisitkun P. The model of circulating immune complexes and interleukin-6 improves the prediction of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2018 Feb 8;8(1):2620

Table 1 Clinical and immunological features of Systemic Lupus Erythematosus patients.

Characteristics	n (%) / Mean (\pmSEM)
Disease duration (years)	10.13 (0.56)
Disease activity	
SLEDAI <6	136 (71.6%)
SLEDAI \geq 6	54 (28.4%)
Nephritis	71 (48.3%)
C3 (mg/dL)	141.33 (1.99)
C4 (mg/dL)	21.07 (0.75)
Autoantibodies	
ANA	
positive	136 (73.0%)
negative	50 (23.7%)
Anti-dsDNA	
positive	86 (45.5%)
negative	103 (45.5%)
Anti-RO/SSA	
positive	47 (40.9%)
negative	68 (59.1%)
Anti-LA/SSB	
positive	15 (11.6%)
negative	114 (88.4%)
Anti-SM	
positive	31 (24.6%)
negative	95 (75.4%)
Anti-URNP	
positive	55 (44.7%)
negative	68 (55.3%)
Anti-Nucleosome	
positive	92 (70.8%)
negative	38 (29.2%)

Treatment	
Prednisone	170 (95.5%)
Prednisone (mg/day)	12.19 (0.80)
Mycophenolate	42 (22.5%)
Antimalarial	141 (75.4%)
Other immunosuppressive	81 (43.3%)

Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) or mean and standard error of the mean (SEM). SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; ANA: anti-nuclear antibodies; Anti-dsDNA: double-stranded DNA antibodies; Anti-SM: anti-Smith antibodies; Anti-URNP: ribonucleoprotein antibodies; C3: Complement C3; C4: Complement C4

Table 2 Socio-demographic variables in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls.

	Control (n=226)	SLE (n=195)	F / χ^2	df	P	p ^a
Age (Year)*	43.53 (1.03)	40.80 (0.96)	2.196	1/414	0.139	---
Gender (F/M)	202 (89.4%)/ 24 (10.6%)	181 (92.4%)/ 14 (7.2%)	1.906	1	0.167	---
Ethnicity (C/NC)	182 (80.5%)/ 44 (19.5%)	123 (63.1%)/ 72 (36.9%)	15.976	1	<0.001	---
BMI (kg/m ²)*	25.81 (0.32)	27.64 (0.40)	12.342	1/401	<0.001	---
TNF- α (pg/mL)*	16.59 (4.42)	19.05 (6.92)	7.976	1/275	0.005	0.019
TNF-β polymorphism						
Allele Frequency						
B1	155 (34.0%)	116 (29.7%)	2.219	1	0.136	0.199
B2	297 (66.0%)	274 (70.3%)				
Additive model						
B1/B1	21 (9.3%)	14 (7.2%)	2.244	2	0.326	0.399
B1/B2	113 (50.0%)	88 (45.1%)				
B2/B2	92 (40.7%)	93 (47.7%)				
Dominant Model						
B1/B2+B1/B1	134 (59.3%)	102 (52.3%)	2.514	1	0.167	0.176
B2/B2	92 (40.7%)	93 (47.7%)				

Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) or mean (\pm SEM). *Data were processed in natural logarithm (Ln) transformation. ^aAdjusted for ethnicity and BMI. BMI: body mass index; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; TNF- β : tumor necrosis factor β ; B1/B1 homozygous genotype for the allele B1 (with guanine at position +252 in the first intron of the TNF- β gene); B2/B2 homozygous genotype for the allele B2 with adenine at position +252 in the first intron of the TNF- β gene; B1/B2 heterozygous genotype;

Table 3 Demographic, clinical, and inflammatory markers according to *TNF-β* (+252 G>A) polymorphism in patients with Systemic Lupus Erythematosus.

	B1/B2 + B1/B1 (n=102)	B2/B2 (n=93)	χ²/F	Df	p
Age (year)	41.56 (1.34)	39.98 (1.36)	0.677	1/191	0.412
Gender (F/M)	97 (95.1)/ 5 (4.9)	83 (90.2)/ 9 (9.8)	1.721	1	0.190
Ethnicity (C/NC)	64 (62.7)/ 38 (37.3)	57 (62.6)/ 34 (37.4)	0.001	1	0.988
BMI (kg/m ²)	27.50 (0.51)	27.48 (0.68)	0.000	1/87	0.983
Disease duration (years)	10.23 (0.76)	10.00 (0.83)	0.042	1/182	0.839
SLEDAI	3.70 (0.36)	4.42 (0.48)	1.894	1/146	0.171
SLEDAI≥6	24 (23.8)	30 (33.7)	2.300	1	0.129
Nephritis	36 (47.4)	35 (49.3)	0.055	1	0.815
TNF-α (pg/mL) *	3.39 (0.86)	24.04 (11.31)	4.317	1/115	0.040
C3 (mg/dL)	114.56 (2.61)	109.90 (3.03)	1.92	1/192	0.167
C4 (mg/dL)	21.75 (1.16)	20.32 (0.93)	0.939	1/192	0.334
Autoantibodies					
ANA (positive)	73 (75.0)	63 (70.9)	0.382	1	0.537
Anti-dsDNA (positive)	51 (53.1)	44 (52.4)	0.010	1	0.921
Anti-dsDNA (IU/mL) *	51.51 (6.69)	54.96 (8.64)	0.269	1/164	0.605
Anti-RO/SSA (positive)	26 (44.8)	21 (36.8)	0.759	1	0.384
Anti-RO/SSA (UI/mL) *	45.98 (7.28)	55.42 (16.09)	1.046	1/113	0.309
Anti-LA/SSB (positive)	10 (15.9)	5 (7.6)	2.259	1	0.142
Anti-LA/SSB (UI/mL) *	13.08 (3.10)	7.31 (2.02)	2.343	1/128	0.128
Anti-SM(positive)	18 (29.5)	13 (20.0)	1.534	1	0.216
Anti-SM (UI/mL) *	19.75 (3.47)	14.21 (2.59)	1.077	1/124	0.301
Anti-URNP (positive)	30 (51.7)	25 (38.5)	2.181	1	0.140
Anti-URNP (UI/mL) *	49.06 (6.69)	34.79 (5.48)	4.46	1/121	0.037
Anti- nucleosome (positive)	48 (70.6)	44 (71.0)	0.002	1	0.962
Anti-nucleossomo (UI/mL)	91.63 (12.34)	81.95 (13.28)	0.357	1/128	0.551

Treatment					
Antimalarials	76 (75.2)	65 (73.0)	0.121	1	0.128
Prednisone	87 (94.6)	85 (96.6)	0.435	1	0.510
Micofenolato	20 (19.8)	22 (24.7)	0.664	1	0.415
Immunosuppressive	46 (45.5)	38 (42.7)	0.156	1	0.693

Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) or mean (\pm SEM). *Data were processed in natural logarithm (Ln) transformation. TNF- β : tumor necrosis factor β ; B1/B1 homozygous genotype for the allele B1 (with guanine at position +252 in the first intron of the *TNF- β* gene); B2/B2 homozygous genotype for the allele B2 with adenine at position +252 in the first intron of the *TNF- β* gene; B1/B2 heterozygous genotype; BMI: body mass index; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; ANA: anti-nuclear antibodies; Anti-dsDNA: double-stranded DNA antibodies; Anti-SM: Smith antibodies; Anti-URNP: ribonucleoprotein antibodies; C3: Complement C3; C4: Complement C4.

Table 4 Results of three binary logistic regressions analyses (forward stepwise) with disease activity as dependent variable (SLEDAI <6 as reference group) and presence of anti-dsDNA (#1), anti-Smith (#2) or both (#3), and demographic, clinical and treatment data as explanatory variables according *TNF- β* (+252 A>G) polymorphism.

Regression	Group	Explanatory Variables	Wald	df	p	OR (95%CI)
#1	B1/B2+B1/B1	BMI	5.059	1/85	0.024	1.12 (1.01-1.24)
	B2/B2	Anti-dsDNA (+)	8.262	1/78	0.004	4.50 (1.61-12.54)
#2	B1/B2+B1/B1	-	-	-	-	-
	B2/B2	Anti-SM (+)	6.657	1/54	0.010	16.87 (1.97-44.38)
#3	B1/B2+B1/B1	-	-	-	-	-
	B2/B2	Anti-dsDNA(+) Anti-SM (+)	5.131	1/52	0.024	12.23 (1.40-46.86)

TNF- β : tumor necrosis factor β ; B1/B1 homozygous genotype for the allele B1 (with guanine at position +252 in the first intron of the TNF- β gene); B2/B2 homozygous genotype for the allele B2 with adenine at position +252 in the first intron of the TNF- β gene; B1/B2 heterozygous genotype; OR: odds ratio; BMI: body mass index; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; Anti-dsDNA: double-stranded DNA antibodies; Anti-SM: Smith antibodies.

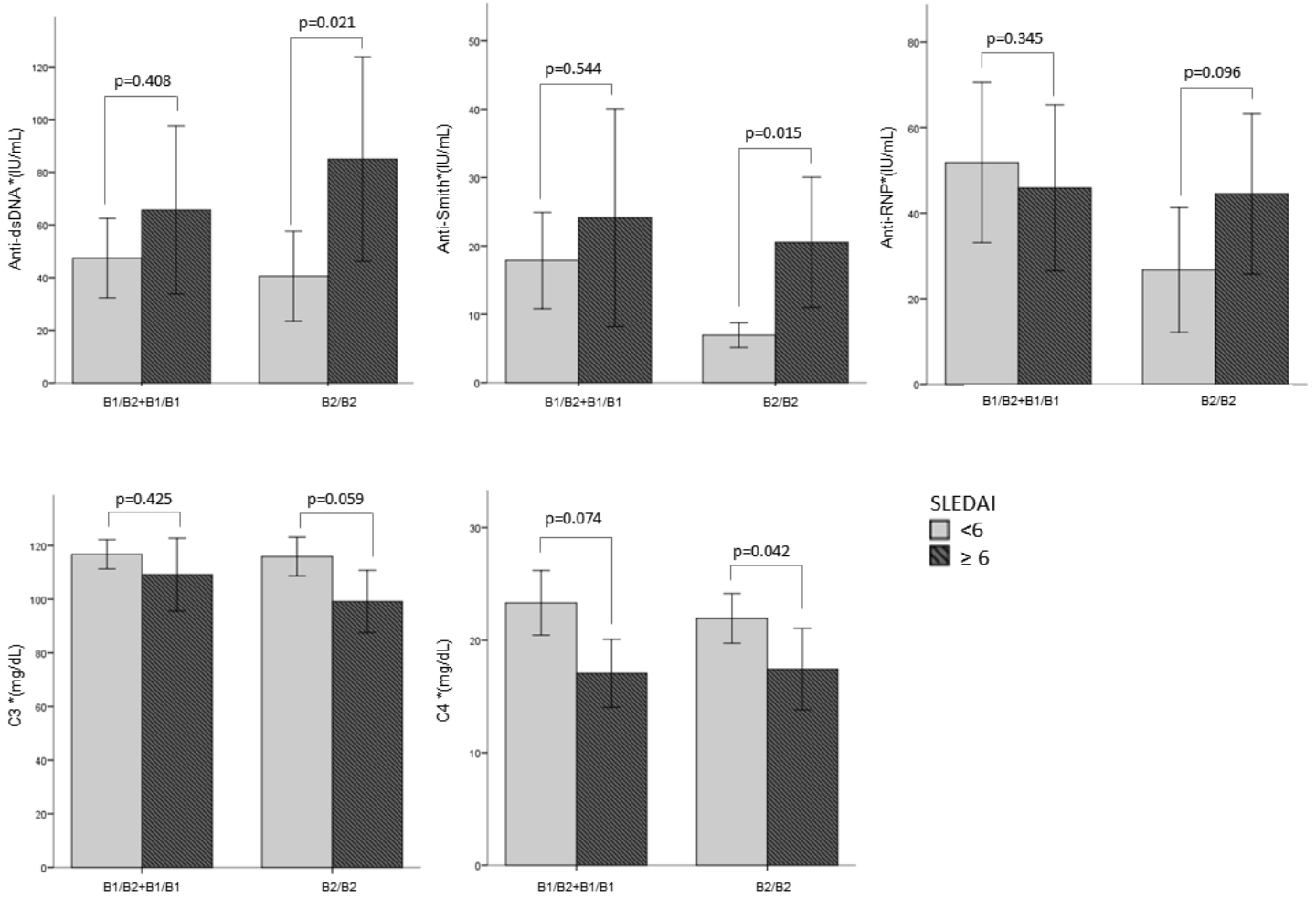


Figure 1. Autoantibodies and C3 and C4 levels according to the presence of disease activity and *TNF-β* (+252 A>G) polymorphism. Data expressed by mean (95%CI). p value was adjusted for sex, age, BMI, disease duration, treatment and presence of nephritis. SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; Anti-dsDNA: double-stranded DNA antibodies; Anti-SM: Smith antibodies; Anti-URNP: ribonucleoprotein antibodies; C3: Complement C3; C4: Complement C4.

6. Conclusões da Dissertação

- Não houve diferença na frequência do polimorfismo do *TNF- β* em pacientes com LES e em indivíduos controle.
- O polimorfismo do *TNF- β* não foi associado a presença de LES e a alteração nos níveis plasmáticos de *TNF- α*
- Não houve associação entre a presença do polimorfismo do *TNF- β* e a atividade da doença avaliada pelo escore SLEDAI
- Não houve associação entre a presença do polimorfismo do *TNF- β* e a presença e os níveis de autoanticorpos
- Os níveis de autoanticorpos anti-dsDNA, anti-Sm ou de ambos estão associados a atividade da doença (SLEDAI ≥ 6) somente em pacientes que apresentam o genótipo B2/B2

REFERÊNCIAS:

- ABARI. **2015 ACR/SLICC Revised Criteria for Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus**. Autoimmune Dis Ther Approaches, Acesso aberto 2:114
- AHMED, H. et al. **Association between TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms and systemic lupus erythematosus**. Molecular Biology Reports, v. 41, n. 4, p. 2029–2036, Abr 2014.
- ALBA, P. et al. **Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis**. Annals of the rheumatic diseases, v. 62, n. 6, p. 556–560, 2003.
- ALUNNO, A. et al. **Balance between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus: The Old and the New**. Clinical and Developmental Immunology, v. 2012, p. 1–5, 2012.
- AN, Ning et al. **Chloroquine Autophagic Inhibition Rebalances Th17/Treg-Mediated Immunity and Ameliorates Systemic Lupus Erythematosus**. Cellular Physiology and Biochemistry, v. 44, n. 1, p. 412–422, 2017.
- ANAM, K. et al. **Severe tissue trauma triggers the autoimmune state systemic lupus erythematosus in the MRL/++ lupus-prone mouse**. Lupus, v. 18, n. 4, p. 318–331, Abr 2009.
- BAI, Y. et al. **Self-dsDNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: Self-dsDNA in SLE**. Clinical & Experimental Immunology, v. 191, n. 1, p. 1–10, Jan 2018.
- BAVE, U. et al. **Fc RIIa Is Expressed on Natural IFN- γ -Producing Cells (Plasmacytoid Dendritic Cells) and Is Required for the IFN- γ Production Induced by Apoptotic Cells Combined with Lupus IgG**. The Journal of Immunology, v. 171, n. 6, p. 3296–3302, 15 Set 2003.
- BETTINOTTI, M. et al. **Polymorphism of the tumor necrosis factor beta gene in systemic lupus erythematosus: TNFB-MHC haplotypes**. Immunogenetics, v. 37, n. 6, p. 449–454, 1993.
- BIERMANN, M. et al. **Surface code—biophysical signals for apoptotic cell clearance**. Physical Biology, v. 10, n. 6, p. 065007, 4 Dez 2013.
- BIJL, M. e LIMBURG, PC. e KALLENBERG, CGM. **New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis**. The Netherlands journal of medicine, v. 59, n. 2, p. 66–75, 2001.
- BOLSTAD, AI. et al. **Association between genetic variants in the tumour necrosis factor/lymphotoxin α /lymphotoxin β locus and primary Sjögren's syndrome in Scandinavian samples**. Annals of the Rheumatic Diseases, v. 71, n. 6, p. 981–988, Jun. 2012.

BOMBARDIER, C. et al. **Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE.** Arthritis and Rheumatism, v. 35, n. 6, p. 630–640, Jun 1992.

BORBA, EF. e BONFÁ, E. **Longterm beneficial effect of chloroquine diphosphate on lipoprotein profile in lupus patients with and without steroid therapy.** The Journal of Rheumatology, v. 28, n. 4, p. 780–785, Abr 2001.

BORBA, EF. et al. **Consenso de lúpus eritematoso sistêmico.** Revista Brasileira de Reumatologia, 2008.

BRESSAN, AL. et al. **Imunossupressores na Dermatologia.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, n. 1, p. 9–22, Fev 2010.

CANADIAN HYDROXYCHLOROQUINE STUDY GROUP. **A randomized study of the effect of withdrawing hydroxychloroquine sulfate in systemic lupus erythematosus.** The New England Journal of Medicine, v. 324, n. 3, p. 150–154, 17 1991.

CARROLL, MC. **A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus.** Nature Reviews Immunology, v. 4, n. 10, p. 825–831, 2004.

CARTER, EE. e BARR, SG. e CLARKE, AE. **The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact.** Nature Reviews Rheumatology, v. 12, n. 10, p. 605–620, 25 Ago 2016.

CONRAD, K. **Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases: A Diagnostic Reference**, 2. ed. Lengerich: Pabst Science Publishers,. 2007.

CROW, MK. **Type I Interferon in the Pathogenesis of Lupus.** The Journal of Immunology, v. 192, n. 12, p. 5459–5468, 15 Jun 2014.

D'ANDREA, DM. et al. **Lupus autoantibodies interact directly with distinct glomerular and vascular cell surface antigens.** Kidney International, v. 49, n. 5, p. 1214–1221, Maio 1996.

DEGIORGIO, LA. et al. **A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus.** Nature medicine, v. 7, n. 11, p. 1189–1193, 2001.

DELONGUI, F. et al. **Association of tumor necrosis factor β genetic polymorphism and sepsis susceptibility.** Experimental and Therapeutic Medicine, v. 2, n. 2, p. 349–356, 2011.

ELORANTA, ML. e RÖNNBLUM, L. **Cause and consequences of the activated type I interferon system in SLE.** Journal of Molecular Medicine, v. 94, n. 10, p. 1103–1110, Out 2016.

ESPOSITO, S. et al. **Infections and systemic lupus erythematosus.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 33, n. 9, p. 1467–1475, Set 2014.

FARRERA, C. e FADEEL, B. **Macrophage Clearance of Neutrophil Extracellular Traps Is a Silent Process**. *The Journal of Immunology*, v. 191, n. 5, p. 2647–2656, 1 Set 2013

FLECHSIG, A. et al. **What is the clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus? A comparison with anti-dsDNA antibodies and C3**. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 35, n. 4, p. 598–606, Ago 2017.

FORTE, WCN. et al. **The phagocytosis by polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus**. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 49, n. 1, p. 35–39, 2003.

FORTUNA, G. e BRENNAN, MT. **Systemic Lupus Erythematosus**. *Dental Clinics of North America*, v. 57, n. 4, p. 631–655, Out 2013.

FRANCESCHINI, F. e CAVAZZANA, I. **Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies**. *Autoimmunity*, v. 38, n. 1, p. 55–63, Fev 2005.

FREIRE, EA. e SOUTO, LM. e CICONELLI, RM. **Medidas de avaliação em lúpus eritematoso sistêmico**. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2011.

GALLUZZI, L et al. **Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015**. *Cell Death & Differentiation*, v. 22, n. 1, p. 58–73, Jan 2015.

GUIMARÃES-COSTA, AB. et al. **ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death**. *Journal of Parasitology Research*, v. 2012, p. 929743, 2012.

GUIMARÃES, PM. et al. **Cytokines in systemic lupus erythematosus: far beyond Th1/Th2 dualism lupus: cytokine profiles**. *Immunology and Cell Biology*, v. 95, n. 9, p. 824–831, Out 2017.

HOCHBERG, MC. **Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus**. *Arthritis & Rheumatology*, v. 40, n. 9, p. 1725–1725, 1997.

HOLMES, CL. e RUSSELL, JA. e WALLEY, KR. **Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy**. *Chest*, v. 124, n. 3, p. 1103–1115, Set 2003.

KALLAUR, AP. et al. **Tumor necrosis factor beta (TNF- β) NcoI polymorphism is associated with multiple sclerosis in Caucasian patients from Southern Brazil independently from HLA-DRB1**. *Journal of molecular neuroscience: MN*, v. 53, n. 2, p. 211–221, Jun 2014.

KAMAL, A. e KHAMASHTA, M. **The efficacy of novel B cell biologics as the future of SLE treatment: A review**. *Autoimmunity Reviews*, v. 13, n. 11, p. 1094–1101, Nov 2014.

KIENHÖFER, D. et al. **Experimental lupus is aggravated in mouse strains with impaired induction of neutrophil extracellular traps.** JCI insight, v. 2, n. 10, 18 Maio 2017.

KIM, T. et al. **Systemic lupus erythematosus with nephritis is strongly associated with the TNFB*2 homozygote in the Korean population.** Human Immunology, v. 46, n. 1, p. 10–17, Mar 1996.

KIROU KA., Boumpas DT. Systemic glucocorticoid therapy in systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editores. **Dubois lupus erythematosus.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p. 1175-97.

KNIGHT, JS et al. **Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/ lpr mice.** Annals of the Rheumatic Diseases, v. 74, n. 12, p. 2199–2206, Dez 2015.

LADDHA, NC. et al. **Tumor Necrosis Factor B (TNFB) Genetic Variants and Its Increased Expression Are Associated with Vitiligo Susceptibility.** PLoS ONE, v. 8, n. 11, p. e81736, 27 Nov 2013.

LEE, S. et al. **Review: Decreased tumour necrosis factor-beta production in TNFB*2 homozygote: an important predisposing factor of lupus nephritis in Koreans.** Lupus, v. 6, n. 7, p. 603–609, Set 1997.

LEFKOWITH, JB. et al. **Heterogeneity and clinical significance of glomerular-binding antibodies in systemic lupus erythematosus.** The Journal of clinical investigation, v. 98, n. 6, p. 1373–1380, 1996.

LÓPEZ, P. et al. **A pathogenic IFN α , BLYS and IL-17 axis in Systemic Lupus Erythematosus patients.** Scientific Reports, v. 6, n. 1, Ago 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep20651>>. Acesso em: 17 mar 2018.

LOZOVVOY, M. et al. **Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome.** Lupus, v. 20, n. 13, p. 1356–1364, Nov 2011.

LUI, SL. et al. **Effect of mycophenolate mofetil on severity of nephritis and nitric oxide production in lupus-prone MRL/lpr mice.** Lupus, v. 11, n. 7, p. 411–418, Jul 2002.

MAHAJAN, A. e HERRMANN, M. e MUÑOZ, LE. **Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE.** Frontiers in Immunology, v. 7, p. 35, 2016.

MAJETSCHAK, M. et al. **Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms, Leukocyte Function, and Sepsis Susceptibility in Blunt Trauma Patients.** Clinical and Vaccine Immunology, v. 9, n. 6, p. 1205–1211, 1 Nov 2002.

MAJETSCHAK, M. et al. **Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients.** *Annals of surgery*, v. 230, n. 2, p. 207, 1999.

MEINÃO, I et al. **Controlled trial with chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus.** *Lupus*, v. 5, n. 3, p. 237–241, Jun 1996.

MERRILL, JT. et al. **Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: The randomized, double-blind, phase ii/iii systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 62, n. 1, p. 222–233, Jan 2010.

MESSER, G. et al. **Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 173, n. 1, p. 209–219, 1991.

MIGLIORINI, P. et al. **Anti-Sm and anti-RNP antibodies.** *Autoimmunity*, v. 38, n. 1, p. 47–54, Fev 2005.

NAPIREI, M. et al. **Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice.** *nature genetics*, v. 25, p. 5, 2000.

NOVAK, GV. et al. **Anti-RO/SSA and anti-La/SSB antibodies: Association with mild lupus manifestations in 645 childhood-onset systemic lupus erythematosus.** *Autoimmunity Reviews*, v. 16, n. 2, p. 132–135, Fev 2017.

PANOULAS, VF. et al. **Lymphotoxin 252A>G polymorphism is common and associates with myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis.** *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 67, n. 11, p. 1550–1556, Nov 2008.

PARKS, CG. et al. **Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF- β in a population-based study of systemic lupus erythematosus: associations and interaction with the interleukin-1 α -889 C/T polymorphism.** *Human Immunology*, v. 65, n. 6, p. 622–631, Jun 2004.

PETRI, M. et al. **Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 64, n. 8, p. 2677–2686, Ago 2012.

PISETSKY, DS. **The origin and properties of extracellular DNA: From PAMP to DAMP.** *Clinical Immunology*, v. 144, n. 1, p. 32–40, Jul 2012.

POSTAL, M. e APPENZELLER, S. **The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.** *Cytokine*, v. 56, n. 3, p. 537–543, Dez 2011.

RAZ, E. et al. **Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 142, n. 9, p. 3076–3082, 1 Maio 1989.

RÖNNBLM, L e ELORANTA, M. e ALM, GV. **Role of Natural Interferon- α Producing Cells (Plasmacytoid Dendritic Cells) in Autoimmunity.** *Autoimmunity*, v. 36, n. 8, p. 463–472, Dez 2003.

SACHET, JC. et al. **Chloroquine increases low-density lipoprotein removal from plasma in systemic lupus patients.** *Lupus*, v. 16, n. 4, p. 273–278, Abr 2007.

SANTOS, MJ. et al. **TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus.** *Rheumatology International*, v. 32, n. 8, p. 2239–2244, Ago 2012.

SHRIVASTAV, M e NIEWOLD, TB. **Nucleic Acid Sensors and Type I Interferon Production in Systemic Lupus Erythematosus.** *Frontiers in Immunology*, v. 4, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00319/abstract>>. Acesso em: 17 mar 2018.

SEREDKINA, N. et al. **Lupus nephritis: enigmas, conflicting models and an emerging concept.** *Molecular Medicine*, v. 19, n. 1, p. 161, 2013.

SHAO, W e COHEN, PL. **Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis research & therapy*, v. 13, n. 1, p. 202, 2011.

SHIRAI, T e HIROSE, S. **Molecular pathogenesis of SLE.** *Springer Seminars in Immunopathology*, v. 28, n. 2, p. 79–82, 4 Out 2006.

SUEHIRO, RM. et al. **Uso de micofenolato mofetil em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e nefrite refratária.** *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 44, n. 5, p. 390–396, Out 2004.

SUI, M. et al. **Simultaneous Positivity for Anti-DNA, Anti-Nucleosome and Anti-Histone Antibodies is a Marker for More Severe Lupus Nephritis.** *Journal of Clinical Immunology*, v. 33, n. 2, p. 378–387, Fev 2013.

TAKEUCHI, F. et al. **Genetic contribution of the tumour necrosis factor (TNF) B + 252*2/2 genotype, but not the TNF α , β microsatellite alleles, to systemic lupus erythematosus in Japanese patients.** *International Journal of Immunogenetics*, v. 32, n. 3, p. 173–178, Jun 2005.

TAN, EM. et al. **The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis & Rheumatology*, v. 25, n. 11, p. 1271–1277, 1982.

TOUMA, Z. e GLADMAN, DD. **Current and future therapies for SLE: obstacles and recommendations for the development of novel treatments.** *Lupus Science & Medicine*, v. 4, n. 1, p. e000239, Dez 2017.

UMARE, VD. et al. **Impact of TNF- α and LT α gene polymorphisms on genetic susceptibility in Indian SLE patients.** *Human Immunology*, v. 78, n. 2, p. 201–208, Fev 2017.

VILLANUEVA, E. et al. **Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus.** *The Journal of Immunology*, v. 187, n. 1, p. 538–552, 1 Jul 2011.

WATERER, GW. e WUNDERINK, RG. **Science review: Genetic variability in the systemic inflammatory response.** *Critical Care*, v. 7, n. 4, p. 308, 2003.

WU, X. et al. **Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: Implications for systemic autoimmunity.** *Arthritis & Rheumatism*, v. 44, n. 11, p. 2642–2652, Nov 2001.

YEE, C. et al. **BILAG-2004 index captures systemic lupus erythematosus disease activity better than SLEDAI-2000.** *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 67, n. 6, p. 873–876, 21 Jan 2008.

ZEINAB, M. et al. **Selective adsorption of antiphospholipid and anti-dsDNA autoantibodies on histidine based pseudobioaffinity adsorbent from sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE).** *Journal of Chromatography B*, v. 975, p. 77–83, Jan 2015.

ZHANG, C. et al. **Association of lymphotoxin alpha polymorphism with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis.** *International journal of rheumatic diseases*, v. 18, n. 4, p. 398–407, 2015.

ZHU, L. et al. **Decreased expressions of the TNF-alpha signaling adapters in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.** *Clinical Rheumatology*, v. 26, n. 9, p. 1481–1489, 27 Jul 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE 2 – FICHA DE AVALIAÇÃO
FICHA DE AVALIAÇÃO - PROJETO LES

NOME:	PRONTUÁRIO:
DATA NASC:	CAUCASIANO () NAO CAUC ()
END:	TEL:
<p>MEDICAMENTOS</p> <p>PREDNISONA:</p> <p>HIDROXICLOROQUINA/CLOROQUINA:</p> <p>METOTREXATE:</p> <p>AZATIOPRINA:</p> <p>MICOFENOLATO MOFETIL:</p> <p>OUTROS IMUNOSSUPRESSORES:</p> <p>OUTROS:</p>	
<p>OUTRAS DOENÇAS:</p> <p>HAS SIM () NÃO ()</p> <p>DIABETES SIM () NÃO ()</p> <p>AVC/IAM SIM () NÃO ()</p> <p>OUTROS:</p>	
<p>NEFRITE LÚPICA</p> <p>SIM () NÃO ()</p> <p>OBS:</p>	
TEMPO DE DOENÇA:	

ESCORE SLEDAI:				
TABAGISMO: SIM () NÃO ()				
ATIVIDADE FÍSICA: SIM () NÃO ()				
PESO	ALTURA	IMC	CIRC. ABDOMINAL	PRESSÃO ARTERIAL

APÊNDICE 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa:

“ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) BETA +252 A>G (rs909253) COM OS NÍVEIS PASMÁTICOS DE TNF- α E COM AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM ATIVIDADE”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) BETA +252 A>G (rs909253) COM OS NÍVEIS PASMÁTICOS DE TNF- α E COM AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM ATIVIDADE”** 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. Pode ocorrer hematoma pós punção venosa para a coleta das amostras.

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**, 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.

ANEXOS

ANEXO 1- Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-SLEDAI
(BOMBARDIER et al., 1992)

Fator de ponderação	SLEDAI escore	Descrição	Definição
8		Convulsão	Instalação recente excluindo causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8		Psicose	Alteração da função mental normal devido a alterações graves da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, associações livres, empobrecimento do conteúdo do pensamento, pensamento marcadamente ilógico, comportamento bizarro desorganizado ou catatônico. Excluir uremia e causas farmacológicas/drogas
8		Síndrome órgão-cerebral	Função mental alterada com alteração da orientação, memória ou outra função intelectual com rápida instalação e flutuação dos achados clínicos incluindo obnubilação da consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de manter a atenção ao ambiente envolvente, mais pelo menos duas das seguintes: distúrbios da percepção, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, aumento ou decréscimo da atividade psicomotora. Excluir causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8		Distúrbios visuais	Alterações da retina ligado ao LES, incluindo corpos coróides, hemorragias retinianas, exsudato seroso ou hemorragia no coróide ou nevríte óptica. Excluir HTA ou causa infecciosa ou causada por drogas
8		Distúrbios nos pares cranianos	Instalação recente de neuropatia sensitiva ou motora atingindo os

			pares cranianos
8		Cefaléia lúpica	Cefaleia severa, persistente; pode ser tipo migranosa mas deve ser resistente à terapêutica narcótica
8		AVC	Instalação recente de AVC. Excluir arteriosclerose
8		Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungeoal, hemorragias sub-ungueais, ou biópsia ou angiograma compatíveis com vasculite
4		Artrite	Mais de duas articulações com dor e sinais inflamatórios
4		Miosite	Dor/fraqueza muscular proximal, associado com elevação da CK/aldolase ou eletromiografia ou biópsia compatível com miosite
4		Cilindros urinários	Cilindros de eritrócitos ou de granuloses
4		Hematúria	>5 células por campo. Excluir litíase, infecção ou outra causa
4		Proteinúria	>0,5g/24h. Instalação recente ou aumento > 0,5g/24h
4		Piúria	>5 leucócitos por campo. Excluir infecção
2		<i>Rash</i>	Instalação recente ou recorrência de <i>rash</i> do tipo inflamatório
2		Alopécia	Instalação recente ou recorrência de perda anormal difusa ou localizada de cabelo
2		Ulcerações Nasais	Instalação recente ou recorrência de ulcerações nasais
2		Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural, derrame ou espessamento pleural
2		Pericardite	Dor pericárdica mais pelo menos um dos seguintes: atrito, derrame, ou confirmação eletrocardiográfica ou por ecocardiograma

2		Hipocomplementemia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
2		Aumento do DNA ligante	>25% ligado pelo ensaio de Farr ou acima dos valores de referência do laboratório
1		Trombocitopenia	< 100.000 plaquetas/mm ³
1		Leucopenia	< 3.000 leucócitos/mm ³ . Excluir causas farmacológicas
1		Febre	>38 ^o C, excluir causa infecciosa
		ESCORE SLEDAI TOTAL (1-105)	