



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FRANCIELI DELONGUI

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS rs1800947 E rs1130864 NO  
GENE DA PROTEÍNA C-reativa EM PACIENTES COM  
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO:  
ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA,  
NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C-reativa E MARCADORES  
DE ATIVIDADE DA DOENÇA**

FRANCIELI DELONGUI

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS rs1800947 E rs1130864 NO  
GENE DA PROTEÍNA C-reativa EM PACIENTES COM  
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO:  
ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA,  
NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C-reativa E MARCADORES  
DE ATIVIDADE DA DOENÇA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche.

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão.

Londrina  
2016

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

D361e Delongui, Francieli.

Estudo dos polimorfismos rs1800947 e rs1130864 no gene da proteína C-reativa em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico : associação com a susceptibilidade genética, níveis séricos de proteína C-reativa e marcadores de atividade da doença / Francieli Delongui. - Londrina, 2016.  
135 f.: il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Lúpus eritematoso sistêmico - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3. Proteínas - Teses. 4. Autoimunidade - Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Simão, Andréa Name Colado. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 616.5-002.525.2

FRANCIELI DELONGUI

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS rs1800947 E rs1130864 NO GENE  
DA PROTEÍNA C-reativa EM PACIENTES COM LÚPUS  
ERITEMATOSO SISTÊMICO:  
ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA, NÍVEIS  
SÉRICOS DE PROTEÍNA C-reativa E MARCADORES DE ATIVIDADE  
DA DOENÇA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Abel Esteves Soares  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de abril de 2016.

## **DEDICO**

A Deus, que sempre me ouviu nas horas em que eu pedia força, coragem e serenidade para prosseguir no caminho escolhido;

Aos meus pais, Luiz e Nice, de quem tanto me orgulho, por sempre apoiarem qualquer escolha feita por mim e por me ensinarem que o caráter e a honestidade são o que realmente importam na vida;

Ao meu irmão e amigo, Marcos Henrique, que sempre ouviu todos os meus desabaços e dúvidas, e sempre me ajudou a resolver problemas que estavam ao nosso alcance;

A todos os meus amigos da ONG Associação Mundo Animal de Rolândia (AMAR), em especial Regina, Marcos, Gelza, Antônio, Ida, Jacira, Lúcia, Valdelei, Wanda, Albina, Estela, Juliano, Rose e Mariza, por me mostrarem que o que realmente enche nossa vida de significado, alegria e paz é o bem que fazemos aos outros sem esperar nada em troca e que o trabalho voluntário é bom para quem recebe, mas é melhor ainda para quem pratica;

Obrigada a todos vocês!!!

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, por me aceitar como sua orientanda e por possibilitar meu aprendizado na área que mais me fascina: a biologia molecular. Eu fico admirada como você, mesmo com tantos anos de profissão, ainda é extremamente apaixonada pelo que faz e consegue passar esse entusiasmo para todos nós. Obrigada por estar sempre acessível para me ajudar e me apoiar; você foi Orientadora de Verdade;

A Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão, por ser minha co-orientadora e estar sempre disposta a me ajudar em todas as fases da pesquisa. Admiro muito sua força e determinação em tudo que faz e também o seu amor pela pesquisa científica. Você é uma pessoa que merece colher os melhores frutos da vida, pois está plantando as sementes da persistência e do esforço;

Ao Prof. Dr. Marcell Allysson Batisti Lozovoy, do Setor de Imunologia Clínica do Hospital Universitário/UEL por ter iniciado os estudos com Lúpus Eritematoso Sistêmico no laboratório e por ter me permitido usar suas amostras para o meu trabalho;

As Profa. Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida e Profa. Dra. Helena Kaminami Morimoto, do Setor de Imunologia Clínica do Hospital Universitário/UEL, obrigada por compartilharem seus conhecimentos e experiências com todos nós;

A todos os amigos mestrandos e doutorandos dos Programas de Pós Graduação em Ciências da Saúde (CCS) e em Patologia Experimental (CCB) da UEL: Daniela Frizon Alfieri, Tamires Flauzino, Nicole Perugini Stadtlober, Sayonara Rangel Oliveira, Ana Paula Kallaur, Katerine Zanin Ferreira, Bruna Miggloranza Scavuzzi, Nayara Rampazzo, Thiago Hissnauer Leal Baltus, Lucas da Silva Liberatti e Jorge Salles; vocês demonstram tanto amor e alegria pelo que fazem que eu, realmente, fiquei fascinada com os jovens dedicados e esforçados que vocês todos são; todos merecem o melhor que a vida pode dar;

A todos os funcionários dos Setores de Imunologia Clínica e Diagnóstico Molecular do Hospital Universitário/UEL: Rosélia, Eronisa, Cíntia, Ingrid, Dirce, Elizabeth, Eliel, Jovelina, Heloísa, Antônio Carlos, Marcos, Atílio e Ivair, muito obrigada pela atenção e carinho com que sempre fui recebida por vocês;

Aos médicos e residentes do Ambulatório de Especialidades em Reumatologia do Hospital Universitário/UEL, em especial a Dra. Neide Tominura Costa, Dra. Tatiana Mayumi Veiga Iryioda, Dr. Alex Francisco Morteau, Dra. Anna Hermínia Castro Gomes de Amorim, Dra. Ana Luísa Berti Guimarães e Dra. Bianca Cantoni de Andrade, por nos ajudarem com os pacientes realizando uma avaliação clínica perfeita, sem a qual não seríamos capazes de realizar nossas pesquisas, e por realmente darem aos pacientes toda a atenção e cuidado que eles merecem;

A todos os funcionários do Hemocentro Regional de Londrina por permitirem o recrutamento dos doadores de sangue no Hemocentro; e agradecimentos especiais aos funcionários que trabalham na coleta das bolsas de sangue pois, sem a ajuda deles, nada seria possível;

Agradecimentos especiais ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde da UEL, pela oportunidade e apoio para a realização do curso de doutorado;

Agradecimentos especiais à Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação do Brasil pelo apoio financeiro na concessão de bolsa de auxílio para o desenvolvimento da minha capacitação;

A todos os doadores de sangue, pacientes e seus familiares que gentilmente aceitaram participar do estudo e a todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram na realização e conclusão desse projeto, o meu muito obrigada.

**“As pessoas não deixam de sonhar porque envelhecem,  
as pessoas envelhecem porque deixam de sonhar.”**

**Gabriel Garcia Marques**

DELONGUI, Francieli. **Estudo dos polimorfismos rs1800947 e rs1130864 no gene da proteína C-reativa em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: associação com a susceptibilidade genética, níveis séricos de proteína C-reativa e marcadores de atividade da doença.** 2016. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

**Introdução:** O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica, de etiologia multifatorial, com interações entre fatores genéticos, ambientais e hormonais. Estudos genômicos independentes identificaram várias regiões genéticas associadas à susceptibilidade ao LES, em particular uma região no braço longo do cromossomo 1, denominada 1q23-24. O gene que codifica a proteína C-reativa (PCR) encontra-se mapeado na região 1q23.2, o que o torna um candidato posicional plausível para ser investigado como um *locus* de susceptibilidade ao LES, além de ser um gene candidato para investigação baseado na atividade fisiológica de seu produto.

**Objetivo:** O objetivo desse estudo foi determinar a associação entre os polimorfismos rs1130864 e rs1800947 no gene *PCR* com a susceptibilidade genética ao LES, níveis séricos de PCR e marcadores de atividade da doença em pacientes do sul do Brasil.

**Material e Métodos:** O estudo caso-controle incluiu 183 pacientes atendidos no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, entre 2009 a 2015, com diagnóstico de LES e 138 doadores de sangue saudáveis. Os dados demográficos e clínicos foram obtidos com a aplicação de questionário padrão e prontuário médico. O DNA genômico foi extraído das células do sangue periférico e fragmentos de 460 pares de bases (pb) e de 744 pb do gene *PCR* foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase para a genotipagem dos rs1130864 e rs1800947, respectivamente. Os produtos obtidos foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *HpyCH4III* (para o rs1130864) e *MaeIII* (para o rs1800947) e analisados pelo método do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). A contagem de leucócitos periféricos e os níveis séricos de PCR, C3, C4, interleucina (IL)-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , anticorpos antinucleares (FAN), anticorpos contra o DNA de dupla fita (anti-dsDNA) e anti-nucleossomo foram determinados no momento da inclusão no estudo. A atividade da doença foi determinada pelos critérios estabelecidos pelo escore SLEDAI.

**Resultados:** Na análise do rs1130864, avaliado em 176 pacientes e 137 controles, pacientes e controles não diferiram quanto a idade, sexo e etnia. A doença ativa foi observada em 46 (26,10%) pacientes. Quando comparados aos controles, os pacientes apresentaram maiores IMC ( $p=0,046$ ) e níveis séricos de PCR ( $p=0,017$ ), mesmo após análise de regressão logística binária. A maioria dos pacientes (73,90%) apresentou doença inativa (SLEDAI $<6$ ), exibiu soropositividade para FAN e anticorpos anti-dsDNA em 71,60% e 53,40% dos casos, respectivamente. A distribuição dos genótipos do rs1130864 estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p>0,05$ ). Nos pacientes, a frequência dos genótipos CC, CT e TT foi de 84 (47,70%), 71 (40,40%) e 21 (11,90%), respectivamente. No grupo controle, a frequência destes genótipos foi de 88 (64,20%), 43 (31,40%) e 6 (4,40%),

respectivamente. Os genótipos CT e TT foram mais frequentes entre os pacientes com LES que nos controles, [*odds ratio* (OR) de 1,730, intervalo de confiança (IC) 95%: 1,068-2,803,  $p=0,035$  e OR: 3,667, (IC) 95%: 1,410-9,533,  $p=0,009$ , respectivamente]. A frequência do alelo T também foi maior nos pacientes comparados aos controles (OR: 1,883; IC 95%: 1,299–2,728;  $p=0,001$ ). Quando os níveis séricos de PCR e outros marcadores laboratoriais e de atividade da doença foram avaliados entre os pacientes com LES, de acordo com os genótipos em um modelo dominante de análise, os pacientes que apresentavam, pelo menos, um alelo T (CT ou TT), comparados aos que apresentavam o genótipo CC, mostraram níveis mais elevados de PCR ( $p=0,014$ ), eram mais frequentemente Caucasianos ( $p=0,018$ ) e não faziam uso de imunossupressores como terapia ( $p=0,004$ ), mesmo após análise de regressão logística binária. Na análise do rs1800947, avaliado em 183 pacientes e 138 controles, os indivíduos não diferiram quanto a idade, sexo e etnia. A doença ativa foi observada em 48 (26,20%) pacientes. Quando comparados aos controles, os pacientes apresentaram maiores valores de IMC ( $p=0,015$ ), níveis séricos de PCR ( $p=0,045$ ) e de IL-6 ( $p<0,0001$ ) e menores níveis séricos de TNF- $\alpha$  ( $p<0,0001$ ) e C4 ( $p=0,028$ ), mesmo após análise de regressão logística binária. A maioria dos pacientes (73,80%) apresentou doença inativa (SLEDAI $<6$ ), exibiu soropositividade para FAN e anticorpos anti-dsDNA em 71,60% e 53,60% dos casos, respectivamente. A distribuição dos genótipos do rs1800947 estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p>0,05$ ). Nos pacientes, os genótipos GG e GC foram observados em 166 (90,70%) e 17 (9,30%), respectivamente e nenhum deles apresentou o genótipo CC. No grupo controle, esses genótipos foram observados em 127 (92,00%), 10 (7,30%) e 1 (0,70%), respectivamente. As frequências genotípica e alélica não diferiram entre pacientes e controles (OR: 0,846; IC 95%: 0,383–1,869;  $p=0,830$  e OR: 0,933, IC 95%: 0,438–1,988;  $p=0,990$ , respectivamente). Os níveis séricos de PCR e outros marcadores laboratoriais e de atividade da doença não diferiram entre os pacientes com LES de acordo com os genótipos do polimorfismo rs1800947 em um modelo dominante de análise ( $p>0,05$ ). Entretanto, os pacientes com o genótipo GC apresentaram uma frequência significativamente maior do não uso de drogas antimaláricas (OR: 3,922, IC 95%= 1,410-10,880,  $p=0,013$ ) e uma tendência a valores menores de anti-dsDNA ( $p= 0,068$ ), comparados aos com o genótipo GG.

**Conclusão:** Os resultados demonstraram que, embora o polimorfismo rs1800947 do gene *PCR* não tenha sido associado com a susceptibilidade ao LES, atividade da doença e nem aos níveis séricos de PCR, o polimorfismo rs1130864 do gene *PCR* foi associado com a susceptibilidade ao LES e aos níveis séricos de PCR, mas não com a atividade da doença, em pacientes com LES do sul do Brasil. Nossos resultados podem sugerir que a elevação da PCR esteja relacionada com o polimorfismo rs1130864 e que, provavelmente, essa proteína desempenha um papel inflamatório na fisiopatologia do LES. Entretanto, estes resultados devem ser validados em estudos futuros para uma melhor compreensão do papel destas variantes genéticas nos níveis de PCR e na fisiopatologia do LES.

**Palavras-chaves:** Polimorfismo genético. Lúpus eritematoso sistêmico. proteína C-reativa. Autoimunidade.

DELONGUI, Francieli. **Study of rs1800947 and rs1130864 polymorphisms on the C-reactive protein gene in systemic lupus erythematosus patients:** association with genetic susceptibility, serum levels of C-reactive protein and disease activity markers. 2016. 135 p. Thesis. (Doctoral Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

**Introduction:** Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease presenting multifactorial etiology characterized by interactions between genetic, environmental and hormonal factors. Independent genomic studies have identified several genetic regions associated with susceptibility to SLE, in particular a region in the long arm of chromosome 1, called 1q23-24. The gene encoding C-reactive protein (CRP) is mapped in 1q23.2 region, which makes this gene a plausible positional candidate to be investigated as a susceptibility locus for SLE, as well as being a candidate gene for research based on the physiological activity of your product.

**Objective:** The aim of the present study was to evaluate the association between the rs1130864 and rs1800947 polymorphisms with the susceptibility for SLE and disease activity, as well as with CRP serum levels in SLE Southern Brazilian patients.

**Material and methods:** The case-control study enrolled 183 patients from the Specialized Outpatient of University Hospital, State University of Londrina, Paraná State, during 2009 to 2015, diagnosed with SLE and 138 healthy blood donors. Demographic and clinical data were obtained using a standard questionnaire and medical records. Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells and fragments with 460 base pair (bp) and 744 bp from *CPR* gene were amplified by polymerase chain reaction to genotype for rs1130864 and rs1800947, respectively. The products obtained were subjected to digestion with *HpyCH4III* enzyme (for rs1130864) and *MaellI* enzyme (for rs1800947) and analysed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Peripheral white blood cell counts and CRP, C3, C4, interleukin (IL)-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , antinuclear autoantibodies (ANA), anti-double strand DNA (anti-dsDNA) autoantibodies and anti-nucleosome serum levels were determined at the moment of inclusion in the study. Disease activity was assessed using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI).

**Results:** In the analysis of the rs1130864, evaluated in 176 patients and 137 controls, patients and controls did not differ on age, sex, and ethnicity. Disease activity was observed in 46 (26.10%) patients. Compared to controls, SLE patients presented higher BMI ( $p=0.046$ ) and serum levels of CRP ( $p=0.017$ ), even after binary logistic regression analysis. Most of the patients (73.90%) presented inactive disease (SLEDAI $<6$ ), showed seropositivity for ANA and anti-dsDNA autoantibodies in 71.60% and 53.40%, respectively. The distribution of rs1130864 genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium ( $p>0.05$ ). In patients, the frequency of genotypes CC, CT and TT, was 84 (47.70%), 71 (40.40%) and 21 (11.90%), respectively. In control group, the frequency of this genotypes were 88 (64.20%), 43 (31.40%) and 6 (4.40%), respectively. The CT and TT genotypes were more common among SLE patients than in controls compared to the CC genotype [(odds ratio (OR): 1.730, confidence interval (CI) 95%: 1.068-2.803,  $p=0.035$ ; and OR: 3.667, 95% CI: 1.410-9.533,  $p=0.009$ , respectively]. The frequency of the T allele was higher in patients

than controls (OR: 1.883; 95% CI: 1.299-2.728;  $p=0.001$ ). When serum levels of CRP and other laboratory and disease activity markers were evaluated among patients with SLE according to the genotypes in a dominant model of analysis, patients presenting at least one T allele (CT or TT), compared with those presenting the CC genotype, showed higher CRP levels ( $p=0.014$ ), were more frequently Caucasians ( $p=0.018$ ) and were not using immunosuppressor as therapy ( $p=0.004$ ), even after binary logistic regression analysis. In the analysis of the rs1800947, evaluated in 183 patients and 138 controls, patients and controls did not differ on age, sex, and ethnicity. Disease activity was observed in 48 (26.20%) patients. When compared to controls, SLE patients presented higher BMI ( $p=0.015$ ), serum levels of CRP ( $p=0.045$ ), and IL-6 ( $p<0.0001$ ), and lower serum levels of TNF- $\alpha$  ( $p<0.0001$ ) and C4 ( $p=0.028$ ), even after binary logistic regression analysis. Most of the patients (73.80%) presented inactive disease (SLEDAI $<6$ ), showed seropositivity for ANA and anti-dsDNA antibodies in 71.60% and 53.60% of the cases, respectively. The distribution of the rs1800947 genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium ( $p>0.05$ ). The frequency of GG and GC genotype in patients was 166 (90.70%) and 17 (9.30%), respectively and none of them presented the CC genotype. In the control group, the frequency of these genotypes was 127 (92.00%), 10 (7.30%) and 1 (0.70%), respectively. The genotype and allelic frequencies did not differ between patients and controls (OR 0.846, 95% CI: 0.383-1.869;  $p=0.830$  and OR: 0.933, 95% CI: 0.438-1.988  $p=0.990$ , respectively). The serum levels of CRP and other laboratory and disease activity markers did not differ between patients with SLE according to the genotypes of the rs1800947 in a dominant model of analysis ( $p>0.05$ ). However, patients carrying the GC genotype presented a significantly higher frequency of unmedicated with antimalarial drugs (OR: 3.922, 95% CI = 1.410-10.880,  $p=0.0130$ ), as well as a trend toward lower values of anti-dsDNA ( $p=0.068$ ) compared with those carrying the GG genotype.

**Conclusion:** The results showed that, although the rs1800947 *CRP* polymorphism was not associated with SLE susceptibility and disease activity, as well as with the serum levels of CRP, the rs1130864 *CRP* polymorphism was associated with SLE susceptibility and serum levels of CRP, but not with disease activity, in SLE patients from Southern Brazil. Our results may suggest that elevated CRP is related to rs1130864 polymorphism and, probably, this protein plays an inflammatory role in the pathophysiology of SLE. However, these results should be validated with further studies to better understand the role of these genetic variants in CRP levels and SLE pathophysiology.

**Keywords:** Genetic polymorphism. Systemic lupus erythematosus. C-reactive protein. Autoimmunity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
Anti-DNA	Anticorpos contra o DNA
Anti-dsDNA	Anticorpos contra o DNA de fita dupla
Anti-La/SSB	Anticorpos contra a proteína <i>Lane</i>
Anti-Ro/SSA	Anticorpos contra a proteína <i>Robert</i>
Anti-Sm	Anticorpos contra a proteína <i>Smith</i>
Anti-ssDNA	Anticorpos contra o DNA de fita simples
APCs	Células apresentadores de antígenos
<i>BILAG</i>	<i>British Isles Lupus Assessment Group</i>
C	Citosina
CCR5	Receptor de quimiocina 5
CCR5 $\Delta$ 32	Polimorfismo genético delta 32 do gene <i>CCR5</i>
<i>ECLAM</i>	<i>European Community Lupus Activity Measure</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de fita dupla
EBV	Vírus <i>Epstein-Barr</i>
ELISA	Enzima imunoensaio
ENA	Proteínas extraíveis do núcleo
FAN	Anticorpos antinucleares
G	Guanina
GWAS	Estudos de associação <i>genome-wide</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HU	Hospital Universitário
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IMC	Índice de Massa Corporal
IL	Interleucina
IRF5	Fator regulador de Interferon 5
LE	Lúpus Eritematoso
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico

LT	Linfotoxina
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NK	Células <i>natural killer</i>
pb	pares de bases
PBMC	Células mononucleares sanguíneas periféricas
PCR	Proteína C-reativa
RFLP	Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
<i>SLAM</i>	<i>Systemic Lupus Activity Measure</i>
<i>SLEDAI</i>	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
<i>SLICC</i>	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de célula T
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TLR	Receptor <i>toll-like</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral <i>beta</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTR	Região não-transcrita
UV	Ultravioleta
V	Volts
X-C	Xileno-cianol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1</b>	<b>Lúpus Eritematoso Sistêmico</b> .....	16
<b>1.1.1</b>	<b>Epidemiologia</b> .....	16
<b>1.1.2</b>	<b>Etiologia</b> .....	19
1.1.2.1	Fatores ambientais e hormonais .....	19
1.1.2.2	Fatores genéticos .....	20
<b>1.1.3</b>	<b>Imunopatologia</b> .....	22
1.1.3.1	Autoanticorpos.....	22
1.1.3.2	Distúrbios na resposta imune .....	23
1.1.3.3	Perfil de citocinas .....	24
1.1.3.4	Regulação imune defeituosa .....	24
1.1.3.5	Apoptose .....	25
<b>1.1.4</b>	<b>Crterios de classificao, diagnstico e atividade da doena</b> .....	26
<b>1.1.5</b>	<b>Manifestaes clnicas</b> .....	29
<b>1.2</b>	<b>Proteína C-reativa e Lúpus Eritematoso Sistêmico</b> .....	30
<b>1.2.1</b>	<b>Polimorfismos no gene <i>PCR</i> associados ao LES</b> .....	34
<b>1.3</b>	<b>Justificativas</b> .....	39
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	41
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	41
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>3.1</b>	<b>Ética e Consentimento</b> .....	42
<b>3.2</b>	<b>Delineamento</b> .....	42
<b>3.3</b>	<b>Locais de Realizao do Estudo</b> .....	42
<b>3.4</b>	<b>Populao do Estudo</b> .....	42
<b>3.5</b>	<b>Amostragem</b> .....	42
<b>3.6</b>	<b>Crterios de Inclusoo Para o Grupo de Pacientes</b> .....	42
<b>3.7</b>	<b>Crterios de Excluso Para o Grupo de Pacientes</b> .....	43
<b>3.8</b>	<b>Crterios de Seleo para o Grupo de Doadores de Sangue</b> .....	43
<b>3.9</b>	<b>Amostra</b> .....	43

<b>3.9.1</b>	<b>Pacientes</b> .....	<b>43</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Controles</b> .....	<b>43</b>
<b>3.10</b>	<b>Dados Demográficos, Clínicos e Laboratoriais</b> .....	<b>44</b>
<b>3.11</b>	<b>Polimorfismo no Gene da Proteína C-reativa</b> .....	<b>44</b>
<b>3.11.1</b>	<b>Extração do DNA</b> .....	<b>44</b>
<b>3.11.2</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase</b> .....	<b>46</b>
<b>3.11.3</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase para o polimorfismo rs1800947</b> .....	<b>45</b>
<b>3.11.4</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase para o polimorfismo rs1130864</b> .....	<b>48</b>
<b>3.11.5</b>	<b>Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para o polimorfismo rs1800947</b> .....	<b>51</b>
<b>3.11.6</b>	<b>Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para o polimorfismo rs1130864</b> .....	<b>53</b>
<b>3.12</b>	<b>Dosagem dos Níveis Séricos de Proteína C-reativa, Citocinas, Marcadores Inflamatórios e Autoanticorpos</b> .....	<b>55</b>
<b>3.13</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>56</b>
<b>3.14</b>	<b>Pesquisa Bibliográfica</b> .....	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Artigo 1 – GENETIC POLYMORPHISM rs1130864 IN THE C-REACTIVE PROTEIN IS ASSOCIATED WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS SUSCEPTIBILITY AND C-REACTIVE PROTEIN SERUM LEVELS</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Artigo 2 – INFLUENCE OF RS1800947 C-REACTIVE PROTEIN POLYMORPHISM ON SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS SUSCEPTIBILITY, DISEASE ACTIVITY, AND C-REACTIVE PROTEIN CONCENTRATIONS</b> .....	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>114</b>

<b>8</b>	<b>ANEXOS E APÊNDICES .....</b>	<b>124</b>
<b>8.1</b>	<b>Anexo 1 - SLEDAI .....</b>	<b>124</b>
<b>8.2</b>	<b>Anexo 2 – SLEDAI-2K.....</b>	<b>125</b>
<b>8.3</b>	<b>Anexo 3 – Parecer do CEP/UEL.....</b>	<b>126</b>
<b>8.4</b>	<b>Apêndice 1 – TCLE Para o Grupo de Pacientes.....</b>	<b>130</b>
<b>8.5</b>	<b>Apêndice 2 – TCLE Para o Grupo de Controles.....</b>	<b>132</b>
<b>8.6</b>	<b>Apêndice 3 – Questionário Para o Grupo de Controles .....</b>	<b>134</b>
<b>8.7</b>	<b>Apêndice 4 – Questionário Para o Grupo de Pacientes .....</b>	<b>135</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Lupus Eritematoso Sistêmico**

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela produção de autoanticorpos contra antígenos nucleares, deposição de imunocomplexos e subsequentes danos em múltiplos órgãos. Apresenta características clínicas altamente variáveis incluindo glomerulonefrite, doença neuropsiquiátrica e manifestações cutâneas (RUSSELL et al., 2004). A extensão do comprometimento orgânico pode variar enormemente entre os pacientes, de uma doença branda sem dano a uma doença grave com alta taxa de comprometimento orgânico (JONSEN et al., 2007).

A partir da descoberta da célula LE, em 1948, na medula óssea de pacientes com LES (HARGRAVES; RICHMOND; MORTON, 1948) e do teste de imunofluorescência indireta (IFI) para pesquisa de anticorpos antinucleares (FAN) (FRIOU, 1958), muitos outros autoanticorpos foram descritos. Anticorpos contra o DNA (anti-DNA) (DEICHER; HOLMAN; KUNKEL, 1959), anticorpos contra antígenos nucleares solúveis, como a ribonucleoproteína (anti-RNP), proteínas Sm, Ro e La (TAN; KUNKEL, 1966) e anticorpos contra fosfolípidos foram reconhecidos como marcadores de subgrupos clínicos de LES e ajudaram a melhorar o entendimento da patogênese da doença.

#### **1.1.1 Epidemiologia**

A prevalência do LES na população geral é de, aproximadamente, 1:2.000 indivíduos e varia em relação ao sexo, etnia, status socioeconômico, fatores genéticos e ambientais (FERNÁNDEZ et al., 2007). A frequência do LES parece estar aumentando porque as formas mais brandas da doença estão sendo mais reconhecidas (URAMOTO et al., 1999; D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007).

Existe uma grande variação na prevalência de LES em todo o mundo, com as maiores prevalências relatadas na Itália, Espanha e na população Afro-Caribenha do Reino Unido. Os indivíduos com ancestralidade africana ou asiática são os de maior risco para desenvolver a doença, que pode ser muito mais grave nessas etnias quando comparada com pacientes caucasianos (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007; FORTUNA; BRENNAM, 2013).

Cervera et al. (2014) estudaram os padrões de expressão do LES em cinco países europeus (França, Alemanha, Itália, Espanha e Reino Unido) e identificaram claramente subgrupos diferentes de pacientes. Afro-descendentes apresentaram doença mais ativa quando comparados aos caucasianos, sendo o sistema renal mais acometido naqueles pacientes. Em indivíduos com idade de diagnóstico da doença mais precoce, as maiores atividade e dano foram no sistema renal. Já em pacientes com idade mais tardia de

diagnóstico da doença, os maiores danos foram relatados nos sistemas pulmonar e cardiovascular.

A incidência global do LES é abrangente. Se considerarmos a etnia, as maiores incidência e prevalência foram observadas na população afro-descendente. Em um estudo realizado nos Estados Unidos (MCCARTY et al., 1995), a incidência e a prevalência em afro-americanos foram duas a três vezes maiores que em americanos com ascendência europeia. Além disso, outro estudo (BORCHERS et al., 2010) mostrou que o LES é mais comum em americanos nativos do Canadá, em nativos da Nova Zelândia e em aborígenes da Austrália, quando comparados com as respectivas populações europeias (e seus descendentes) que vivem na mesma região. Estes resultados mostram que os europeus e seus descendentes em diferentes países do mundo têm uma menor incidência e prevalência de LES (FORTUNA; BRENNAN, 2013). Na África Ocidental (o local dos ascendentes de muitos afro-americanos) foi relatada uma baixa incidência e prevalência de LES, provavelmente devido a presença de polimorfismos que poderiam alterar a resposta imune, fornecendo algum tipo de proteção contra a autoimunidade (BORCHERS et al., 2010).

Quanto a distribuição do LES de acordo com sexo, os dados são concordantes, já que as mulheres são mais frequentemente afetadas que os homens; no entanto, dados conflitantes ocorrem com relação a idade de início da doença. Usualmente, o LES afeta mulheres adultas, embora em 15% a 20% dos casos possa ocorrer em crianças, parecendo ser mais grave que aquele que se inicia na idade adulta. O pico de incidência entre as mulheres no Reino Unido foi relatado como sendo em 50-54 anos, enquanto que no Canadá foi em 45-64 anos (BORCHES et al., 2010). Esse pico diminui drasticamente em outros países do mundo, sendo de 32,3 anos na população de Hong Kong (MOK et al., 2008), e de 25 anos nas Filipinas (VILLAMIN; NAVARRA, 2008).

Alguns autores relataram que a relação de mulheres:homens com LES é de 9:1 (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007; CERVERA et al., 2014). Nesses estudos, os autores mostraram diferenças na manifestação da doença baseadas no sexo dos pacientes. A média do escore avaliado pelo *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) (PETRI et al., 2012) foi maior em homens e o sistema pulmonar foi mais comumente acometido em homens quando comparado às mulheres.

Há provas substanciais de que as variações geográficas poderiam determinar diferentes características do LES, incluindo a frequência do envolvimento dos órgãos e dos achados imunológicos podendo, assim, influenciar no prognóstico da doença (LAU; YIN; MOK, 2006). Na verdade, o envolvimento cutâneo foi descrito com grande frequência em países tropicais, incluindo o Brasil, devido à grande exposição à luz ultravioleta (UV) (VILAR; SATO, 2002).

Informações sobre a epidemiologia do LES no Brasil são escassas e divergentes, sendo limitadas a determinadas regiões do país (CHAHADE et al., 1995; NAKASHIMA et al., 2011; BORBA et al., 2013) ou a grandes estudos de coorte da América Latina (PONS-ESTEL et al., 2004). O Brasil abrange uma vasta extensão de terra, com uma diversidade de condições climáticas e uma alta taxa de miscigenação racial; portanto, estudos realizados em uma região podem não ser representativos do país como um todo (DAS CHAGAS MEDEIROS et al., 2015).

A prevalência de LES não é precisamente determinada no Brasil e um estudo registrou uma incidência anual de 8,4/100.000 habitantes em uma cidade da região Nordeste (VILAR; SATO, 2002). Outro estudo realizado na região Sudeste (BORBA et al., 2013) mostrou que a maioria de 888 pacientes com LES era do sexo feminino e a taxa de proporção de mulheres para homens foi de 11,3:1. Esses autores também observaram que o início da doença ocorreu entre as segundas e terceiras décadas de vida e os pacientes eram predominantemente caucasianos. Além disso, a idade média de início da doença nas pacientes do sexo feminino foi comparável à dos pacientes do sexo masculino, e não foi observada diferença significativa na sua distribuição ao longo das décadas. A duração média da doença também foi semelhante entre os grupos. Quanto às manifestações clínicas, foi observada uma maior frequência de eritema malar em pacientes do sexo feminino e de nefrite em pacientes do sexo masculino; em relação às características imunológicas, essa população brasileira estudada demonstrou uma baixa prevalência de autoanticorpos específicos do LES.

Em um estudo mais recente realizado na região Nordeste (DAS CHAGAS MEDEIROS et al., 2015), com 414 pacientes com LES, foi encontrada uma predominância da raça não caucasiana e de baixos níveis gerais de escolaridade, refletindo as más condições socioeconômicas da população estudada. Como esperado, a maioria dos pacientes analisados era do sexo feminino (proporção mulher/homem de 14:1) e a média de idade no momento do diagnóstico foi de  $28,9 \pm 10,9$  anos. Quanto às manifestações clínicas, problemas músculo esqueléticos foram os mais frequentes nessa coorte; outras manifestações graves, tais como nefrite, serosite, convulsão e trombocitopenia também foram observadas, possivelmente refletindo uma expressão mais grave da doença em populações do Nordeste do Brasil.

Dados de alguns estudos têm demonstrado que a taxa de sobrevivência em pacientes com LES aumentou muito ao longo dos últimos 50 anos, de menos de 50% na década de 1950 para quase 95% no início do ano 2000 (BERNATSKY et al., 2006). A taxa de mortalidade em pacientes lúpicos em comparação com indivíduos saudáveis, no entanto, continua a ser de 2 a 4 vezes superior. Na América Latina, a taxa de sobrevivência varia de 95% em 5 anos após o diagnóstico e de 78% em 20 anos (PONS-ESTEL et al., 2004). Outro

estudo mostrou que o risco de mortalidade em afro-americanos foi de 2 a 3 vezes maior em comparação com americanos de ascendência europeia (BERNATSKY et al., 2006).

### 1.1.2 Etiologia

A etiologia do LES permanece não totalmente compreendida. Ela é complexa e multifatorial, envolvendo interações entre fatores ambientais, hormonais e genéticos (VYSE; KOTZIN, 1998; SHIH et al., 2008).

#### 1.1.2.1 Fatores ambientais e hormonais

Embora os fatores genéticos e hormonais possam criar uma susceptibilidade ao LES, o gatilho para o início da doença provavelmente resulta de várias causas ambientais e fatores exógenos, como infecção pelo Vírus Epstein Barr (GROSS et al., 2005), agentes físicos/químicos (luz UV), toxinas e medicamentos como hidralazina e procainamida. Estes fatores podem alterar a tolerância imunológica pela exposição de autoantígenos ao sistema imunológico e induzir à autoimunidade por diferentes mecanismos, como mimetismo molecular, inflamação, indução da apoptose celular e danos teciduais. A incidência desses gatilhos ambientais em indivíduos susceptíveis provavelmente é altamente variável e pode ser uma explicação para a heterogeneidade da doença e para os períodos alternados de recidiva e remissão (MOK; LAU, 2003).

Um estudo realizado para avaliar a associação entre os hormônios sexuais e a ocorrência de LES (MCMURRAY; MAY, 2003) demonstrou que o desequilíbrio hormonal pode modular a incidência e gravidade da doença. Os autores demonstraram que os níveis de dehidroepiandrosterona, testosterona e progesterona foram significativamente menores nas pacientes com LES em comparação aos controles saudáveis, enquanto que os níveis de estradiol e prolactina foram maiores. O uso de contraceptivos orais contendo estrogênios também tem sido implicado na etiologia multifatorial do LES. Tanto as concentrações fisiológicas como as suprafisiológicas de estrogênios facilitam as respostas humorais, levando ao aumento da proliferação de células B e à produção de anticorpos (STHOEGER; CHIORAZZI; LAHITA, 1988; KANDA; TAMAKI, 1999). Além disso, doses elevadas de estrogênios inibem as respostas das células T, tais como a proliferação e a produção de interleucina (IL)-2 (MCMURRAY et al., 2001). Portanto, os estrogênios podem agravar o LES de várias maneiras, tais como prolongando a sobrevivência das células autoimunes, aumentando a produção de citocinas da resposta tipo T *helper* 2 (Th2) e estimulando as células B a produzirem autoanticorpos. Mok e Lau (2003) afirmaram que o estrogênio em excesso, aliado a uma atividade hormonal dos androgênios inadequada tanto em homens quanto em mulheres com LES, poderiam ser um dos fatores responsáveis pelas alterações da resposta imunológica.

### 1.1.2.2 Fatores genéticos

Evidências para as origens genéticas do LES vêm da observação da agregação familiar (mais de 10% dos pacientes com a doença possui outro membro da família com LES) e do aumento da concordância em gêmeos monozigóticos (BLOCK et al., 1975; REICHLIN; HARLEY; LOCKSHIN, 1992; ALARCÓN-SEGOVIA et al., 2005). A hereditariedade estimada do LES em caucasianos é de 66% (LAWRENCE; MARTIN; DRAKE, 1987). Essa doença mostra forte agregação familiar e muitas famílias nas quais o LES ocorre apresentam alta propensão para a ocorrência de outros fenótipos autoimunes (CRISWELL et al., 2005).

A transmissão genética do LES tem-se mostrado altamente complexa (SESTAK et al., 2007). Acredita-se que um número variado de genes esteja envolvido, cada um deles contribuindo pouco (genes de baixa penetrância) para o risco genético total (KELLY; MOSER; HARLEY, 2002; MOK; LAU, 2003), sugerindo que a doença seja resultado de uma combinação entre a presença de genes de susceptibilidade com a ausência de genes protetores (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

Em uma pequena proporção de doentes (<5%), um único gene (alta penetrância) pode ser o responsável pelo aparecimento do LES, como a deficiência genética em homozigose nos primeiros componentes do complemento (WALPORT; DAVIES; BOTTO, 1998). Os genes que codificam os componentes do complemento C2 e C4, presentes na região do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), ou Antígeno Leucocitário Humano (HLA) de classe III, apresentam riscos para o LES em determinados grupos étnicos. Uma diminuição na atividade do complemento poderia promover a susceptibilidade à doença ao alterar a neutralização e limpeza dos antígenos próprios e não-próprios. Quando o excesso de antígenos sobrecarrega a capacidade de eliminação do sistema imunológico, a autoimunidade pode aparecer (MOK; LAU, 2003).

No entanto, para a maioria dos pacientes com LES, múltiplos genes são implicados no seu desenvolvimento (FORTUNA; BRENNAN, 2013). Estima-se que, pelo menos, quatro genes de susceptibilidade são necessários para o desenvolvimento da doença (SCHUR, 1995). Estudos de associação revelaram cerca de 30 a 40 *loci* de genes com polimorfismos que aumentam a susceptibilidade ao LES (RHODES; VYSE, 2008; GRAHAM et al., 2009; MOSER et al., 2009).

Dentro da região MHC de classe III, outros genes têm sido envolvidos com a susceptibilidade ao LES, como os que codificam o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e TNF- $\beta$  ou Linfotóxina (LT)- $\alpha$  (ROOD et al., 2000; SUÁREZ et al., 2005; DENG; TSAO, 2010). A susceptibilidade ao LES também envolve polimorfismos genéticos na região MHC de classe II, a região genômica mais estudada em pacientes com LES. Uma associação entre os

alelos *HLA-DR2* e *HLA-DR3* com LES é um achado comum em pacientes de diferentes etnias, com um risco relativo para o desenvolvimento da doença de aproximadamente duas a cinco vezes maior em pessoas que apresentam esses haplótipos (PISETSKY, 1997).

Outros genes relacionados a vários mecanismos da resposta imunológica, não relacionados necessariamente ao HLA, foram também associados ao desenvolvimento do LES, como os que codificam o receptor de célula T (TCR), a IL-6, (SCHUR, 1995; SALMON et al., 1996; KOENE et al., 1998), a IL-10 (ESKDALE et al., 1997; MEHRAN et al., 1998; CHONG et al., 2004), membros da família de receptores Fcγ (*FCGR2A* e *FCGR3A*), receptores *toll-like* (*toll-like receptors – TLR*) e o fator regulador de interferon 5 (*IFN-regulatory factor 5 - IRF5*), esse um dos *loci* não HLA mais fortemente e consistentemente associado ao desenvolvimento de LES (MOSER et al., 2009).

Genes que codificam quimiocinas e seus receptores também têm sido implicados na patogênese e evolução clínica do LES. O polimorfismo do gene que codifica o receptor de quimiocina 5 (*CCR5*), que consiste na deleção de 32 pares de bases (*CCR5Δ32*), tem sido avaliado em diferentes populações e os resultados são conflitantes. O papel protetor do alelo *CCR5Δ32* foi verificado em dois estudos (SCHAUREN et al., 2013; CARVALHO et al., 2013); no entanto, outros estudos verificaram que esse alelo não estava associado com proteção ao LES, mas apresentou associação com a produção de autoanticorpos específicos do LES (AGUILAR et al., 2003; MAMTANI et al., 2008). Em uma coorte de pacientes com LES atendidos no Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), este polimorfismo foi associado com a presença de LES em mulheres Caucasianas e tanto o genótipo *CCR5/CCR5Δ32* quanto o alelo *CCR5Δ32* conferiram maior susceptibilidade ao LES e maior atividade da doença nestas pacientes (BALTUS et al., 2016).

Estudos de associação genômica (*Genome-wide association studies – GWAS*) demonstraram seis regiões genômicas promissoras para serem investigadas em associação ao LES (MOK; LAU, 2003). Em particular, uma região no braço longo do cromossomo 1, chamada 1q23-24, está ligada à doença em muitas populações (MOSER et al., 1998; VYSE; KOTZIN, 1998; SHAI et al., 1999).

Polimorfismos nos genes que codificam proteínas envolvidas em diferentes processos do *clearance* de células apoptóticas e complexos imunes, de alterações da tolerância periférica e da resposta inflamatória podem ter efeitos sinérgicos na susceptibilidade e no fenótipo clínico do LES (JONSEN et al., 2007). O gene que codifica a proteína C-reativa (PCR) encontra-se mapeado na posição 1q23.2 (FLOYD-SMITH et al., 1986; WALSH; DIVANE; WHITEHEAD, 1996). A localização do gene codificador da PCR (gene *PCR*) o torna um candidato posicional lógico para ser investigado como um *locus* de

susceptibilidade ao LES (SHIH et al., 2008). O gene *PCR* também é um candidato funcional baseado na atividade fisiológica de seu produto (RUSSELL et al., 2004; SHIH et al., 2008).

### 1.1.3 Imunopatologia

Os mecanismos envolvidos na patogênese do LES incluem a presença de autoanticorpos, os distúrbios na resposta imune, o perfil alterado de citocinas, uma regulação imune defeituosa dos complexos imunes e defeitos no *clearance* de células apoptóticas.

#### 1.1.3.1 Autoanticorpos

A desregulação da imunidade inata e adaptativa promove a produção de autoanticorpos contra cerca de 150 tipos de antígenos diferentes, os quais são os iniciadores da injúria tecidual (GATTO et al., 2013). Os autoanticorpos são dirigidos contra várias moléculas próprias encontradas no núcleo, citoplasma e na superfície das células, como os fosfolipídeos carregados negativamente (PISETSKY, 2000). Também podem ser direcionados contra moléculas próprias solúveis, tais como IgG e fatores de coagulação (MOK; LAU, 2003). Os mais implicados na patogênese do LES são aqueles dirigidos contra o componente nuclear das células (denominados anticorpos antinucleares e detectados pelo teste de FAN), que incluem autoanticorpos contra DNA de cadeia simples (anti-ssDNA) e de cadeia dupla (anti-dsDNA), contra cromatina e contra proteínas extraíveis do núcleo (ENA), como histona, Smith (Sm), Robert (Ro)/SSA, Lane (La)/SSB e ribonucleoproteína (RNP) (FORTUNA; BRENNAN, 2013). Os mecanismos patogênicos subjacentes pelos quais os autoanticorpos exercem a sua ação são complexos e variáveis e incluem lise celular direta, opsonização celular, deposição de complexos imunes, fixação de complemento e inflamação progressiva (REKVIK et al., 2012).

Os anticorpos antinucleares são os mais característicos e estão presentes em mais de 95% dos pacientes. Anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm são exclusivos em pacientes com LES. De fato, a presença deles está incluída nos critérios de classificação da doença (TAN et al., 1982). Entre todos os diferentes tipos de autoanticorpos antinucleares, apenas o anti-dsDNA foi significativamente associado com a atividade da doença e com danos orgânicos específicos no LES (GUTIERREZ-ANDRIANZEN et al., 2006). A característica mais importante dos anticorpos anti-dsDNA é a sua associação com glomerulonefrite. Entretanto, a correlação entre estes autoanticorpos e nefrite lúpica não é completa porque alguns pacientes com nefrite ativa não apresentam anticorpos anti-dsDNA, ao passo que alguns pacientes com títulos persistentemente elevados de anti-dsDNA podem não mostrar envolvimento renal (MOK; LAU, 2003). Uma explicação para tal achado pode ser o fato de que os anticorpos anti-dsDNA diferem em suas propriedades de acordo com o seu

respectivo isotipo, variando na sua capacidade de fixar o complemento e na sua capacidade em se ligar aos glomérulos causando lesão (VLAHAKOS et al., 1992). Somente certos tipos de anticorpos anti-dsDNA foram considerados patogênicos (HAHN, 1998).

#### 1.1.3.2 Distúrbios na resposta imune

O LES é caracterizado por uma variedade de aberrações no sistema imunológico que envolve células B, células T e células da linhagem monocítica, resultando na ativação de células B policlonais, aumento no número de células produtoras de anticorpos, hipergamaglobulinemia, produção de autoanticorpos e formação de complexos imunes. Parece que uma resposta excessiva e descontrolada de células T ajuda na diferenciação e ativação de células B produtoras de autoanticorpos e, provavelmente, essa seja a via final comum no LES (MOK; LAU, 2003).

A ativação de células B e T requer a estimulação por antígenos específicos. Antígenos ambientais e autoantígenos são absorvidos por células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) ou se ligam a anticorpos presentes na superfície de células B. Tanto as células APCs quanto as células B processam os antígenos em peptídeos para, então, apresentá-los às células T por meio de suas moléculas MHC de superfície. As células T ativadas, por sua vez, estimulam as células B a produzirem autoanticorpos patogênicos. Além da estimulação de contato, a interação entre células T e B é facilitada por várias citocinas, como a IL-10 (MOK; LAU, 2003).

A ativação de células B é anormal em pacientes com LES. O número de células B em todas as fases de ativação está aumentado no sangue periférico de pacientes com a doença (KLINMAN et al., 1991). Parece que as células B de pacientes com LES são mais propensas à ativação policlonal por antígenos e citocinas, entre outros estímulos (MOK; LAU, 2003).

Anormalidades na função das células T também são evidentes em pacientes com LES. Um estudo mostrou que os eventos iniciais da ativação de células T são defeituosos em pacientes com LES em comparação aos controles (FERNANDEZ-GUTIERREZ et al., 1998). Embora as células T estejam ativadas no LES, tanto a sua capacidade de proliferação em resposta à estimulação mitogênica quanto a sua produção de IL-2 estão reduzidas (HORWITZ; GARRETT, 1977; WARRINGTON, 1988). As razões para as respostas T *helper* 1 (Th1) defeituosas no LES permanecem especulativas. *Downregulation* por excesso de citocinas Th2 e falha na interação entre APCs e células T são possíveis mecanismos (GARCIA-COZAR et al., 1996; LAUWERYS; HOUSSIAU, 1998).

### 1.1.3.3 Perfil de citocinas

O perfil de citocinas em pacientes com LES têm sido extensivamente estudado. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com a doença proliferam menos que os controles quando estimuladas com vários antígenos e mitógenos (HORWITZ; GARRETT, 1977). As células T dos pacientes com LES são menos sensíveis a estimulação da IL-2 que as células T dos controles normais (WARRINGTON, 1988). Isso provavelmente seja o resultado de muitos fatores, entre os quais os efeitos de *downregulation* de certas citocinas Th2 (MOK; LAU, 2003).

A descoberta do papel exercido pela IL-10 na patogênese do LES suporta esta hipótese. A IL-10 é uma citocina Th2 que atua como um potente estimulador da proliferação e diferenciação de células B sendo, assim, um mediador potencial da ativação de células B policlonais no LES (MOK; LAU, 2003). Um estudo mostrou que a produção espontânea de IL-10 a partir de células B e de monócitos do sangue periférico dos pacientes com LES é significativamente mais elevada que a de controles (LLORENTE et al., 1994). Além disso, as concentrações séricas de IL-10 são maiores em pacientes com LES quando comparadas aos controles e estão correlacionadas com a atividade clínica e sorológica da doença e também com os títulos de anticorpos anti-dsDNA (GRONDAL et al., 2000).

Células de pacientes com LES portadores de doença inativa cultivadas com IL-10 mostraram um aumento significativo na produção de anticorpos anti-dsDNA (TYRRELL-PRICE; LYDYARD; ISENBERG, 2001). Contrariamente, a adição de IL-12 às células de portadores de LES inibe significativamente tanto a produção espontânea quanto a estimulada de IL-10 e também diminui a produção de anticorpos anti-dsDNA (HOUSSIAU et al., 1997). Além disso, a produção de anticorpos anti-dsDNA nos doentes com LES portadores de doença ativa é inibida na cultura das células com IL-12 (TYRRELL-PRICE; LYDYARD; ISENBERG, 2001). Os resultados destes estudos sugerem que a desregulação no equilíbrio de IL-10/IL-12 desempenha um papel crucial nas respostas imunológicas celulares defeituosas observadas em pacientes com LES (MOK; LAU, 2003).

### 1.1.3.4 Regulação imune defeituosa

Existe evidência considerável do envolvimento de complexos imunes na patogênese de diversas manifestações no LES, incluindo nefrite (OATES; GILKESON, 2002). Acredita-se que uma eliminação prejudicada dos complexos antígeno-anticorpo e sua subsequente deposição tecidual leva a liberação de mediadores inflamatórios e uma gama de células inflamatórias pode induzir um amplo espectro de manifestações clínicas (KYTTARIS et al., 2005). O *clearance* dos complexos imunes pelas células fagocíticas é defeituoso em pacientes com LES. Isso se deve, em parte, a uma inadequada fagocitose dos complexos imunes contendo IgG2 e IgG3. Polimorfismos nos genes que codificam os receptores FcγR de IgG (FcγRIIA e FcγRIIIA) foram associados a uma menor ligação das porções Fc tanto da

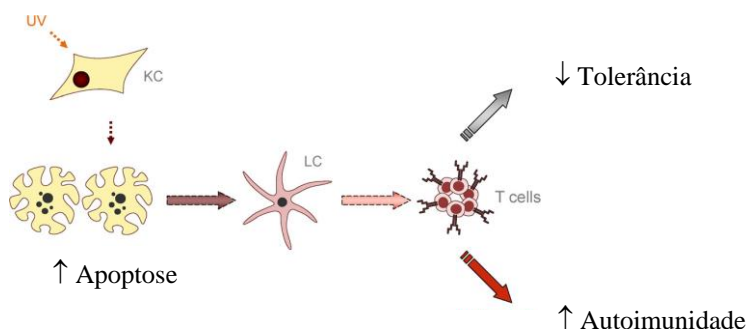
IgG2 quanto da IgG3 e, assim, à uma depuração diminuída dos complexos imunes (SALMON et al., 1996). Portanto, o *clearance* prejudicado dos complexos imunes pelos fagócitos é um mecanismo patogênico importante no LES (MOK; LAU, 2003).

A síntese e secreção de autoanticorpos patogênicos no LES são impulsionadas pela interação de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> com as células B (MOHAN et al., 1993). Portanto, as células que normalmente suprimem a ativação de células B, tais como as células supressoras T CD8<sup>+</sup> e as células *natural killers* (NK), apresentam deficiências na sua atividade supressora. Tem sido demonstrado que as células T CD8<sup>+</sup> e as células NK de pacientes com LES ativo são frequentemente incapazes de regular negativamente a síntese de imunoglobulina policlonal e a produção de autoanticorpos (LINKER-ISRAELI; QUISMORIO; HORWITZ, 1990). Essa capacidade de supressão prejudicada das células B pode ser um fator que contribui para a perpetuação da doença (MOK; LAU, 2003).

#### 1.1.3.5 Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo que leva à destruição ordenada de células evitando a liberação de conteúdos intracelulares para o microambiente extracelular, onde tais substâncias teriam um efeito inflamatório potente. A apoptose defeituosa leva a uma sobrevivência prolongada de linfócitos patogênicos e poderia ser um dos mecanismos para a ocorrência de LES. O aumento na taxa de apoptose no LES teoricamente aumenta a possibilidade de "fuga" dos antígenos intracelulares, os quais poderiam desencadear uma resposta autoimune ou participar da formação de complexos imunes. Sob circunstâncias normais, as células apoptóticas são fagocitadas pelos macrófagos na fase inicial da morte celular programada sem induzir inflamação ou resposta imune (MOK; LAU, 2003).

Apesar da patogênese da doença não ser clara, a noção de apoptose fornece um caminho para explicar como o sistema imune pode reconhecer predominantemente antígenos intracelulares. Autoantígenos são liberados por ambas as células necróticas e apoptóticas. Defeitos no *clearance* de células apoptóticas têm sido descritos nessa doença e esses defeitos parecem levar a uma aberrante captação por macrófagos, os quais então apresentam os antígenos intracelulares previamente às células B e T, levando a um processo autoimune (MUNOZ et al., 2005). Tal situação encontra-se esquematizada na figura 1.



**Figura 1:** Mecanismo de apoptose na autoimunidade presente no lupus eritematoso sistêmico. Após a irradiação ultravioleta (UV), os queratinócitos apoptóticos acumulam-se na pele de pacientes com lupus eritematoso sistêmico. Os restos apoptóticos podem ser processados por células apresentadoras de antígenos, tais como as células de Langerhans, podendo estimular eficientemente células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> via moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e I, respectivamente. Este evento poderia promover o desenvolvimento de autoanticorpos, os quais podem conduzir ao desenvolvimento de autoimunidade. KC: queratinócitos, LC: células de Langerhans.

Fonte: adaptado de Kuhn, Wenzel e Bijl (2016).

A interação entre o receptor Fas e o Fas ligante (FasL) transduz um sinal ativo para apoptose celular (SUZUKI et al., 1998); contudo, tanto a expressão do Fas quanto do FasL é normal em pacientes com LES (MCNALLY et al., 1997) e a apoptose de linfócitos periféricos em pacientes com a doença parece estar aumentada em comparação aos controles (COURTNEY et al., 1999). Portanto, as razões para o *clearance* defeituoso de células apoptóticas no LES não são claras. Pode ser o resultado de defeitos quantitativos ou qualitativos nas proteínas da fase inicial do sistema complemento, como C2, C4 e/ou C1q (MOK; LAU, 2003). Os receptores de C1q na superfície de fagócitos constituem um mecanismo extremamente importante para o *clearance* de células apoptóticas (KORB; AHEARN, 1997). Pacientes ou camundongos com deficiência genética em homozigose para a proteína C1q desenvolvem autoanticorpos e uma síndrome semelhante ao lúpus, aparentemente por causa da incapacidade em eliminar as células apoptóticas eficientemente, levando a um aumento na exposição de autoantígenos ao sistema imune (BOTTO et al., 1998).

Sabe-se que a taxa global de apoptose de linfócitos está aumentada no LES. Aliada aos mecanismos de eliminação deficientes para os materiais apoptóticos observados em pacientes com LES, tais fatores poderiam tornar os indivíduos susceptíveis para o desenvolvimento de anticorpos também contra os nucleossomos (MOK; LAU, 2003).

#### 1.1.4 Critérios de classificação, diagnóstico e atividade da doença

Os primeiros critérios de classificação para LES foram desenvolvidos em 1971, revisados em 1982 (TAN et al., 1982) e adotados pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) em 1997 (HOCHBERG, 1997). Estes critérios foram desenvolvidos e validados para a classificação dos pacientes com a doença estabelecida de longa data. Embora tenham sido desenvolvidos como "critérios de classificação," os critérios do ACR têm sido amplamente utilizados como "critérios de diagnóstico" (ANIC et al., 2014). De acordo com o ACR (HOCHBERG, 1997), o diagnóstico de LES é feito quando 4 ou mais dos 11 critérios clínicos e imunológicos estão presentes, simultaneamente, durante qualquer intervalo de observação. Estes critérios foram revistos e validados pelo grupo SLICC quando o número de critérios passou de 11 para 17 (quadro 1). De acordo com o SLICC, o paciente deve apresentar pelo menos 4 dos 17 critérios de classificação incluindo, pelo menos, um critério clínico e um imunológico, ou apresentar um critério alternativo para o diagnóstico, com a realização de biópsia renal demonstrando padrão de nefrite lúpica + positividade para FAN ou anti-dsDNA (PETRI et al., 2012).

**Quadro 1:** Critérios de classificação do SLICC 2012 para o Lúpus Eritematosos Sistêmico.

CRITÉRIOS CLÍNICOS	
Lúpus cutâneo agudo	Representado clinicamente principalmente pelo <i>rash</i> malar em “asa de borboleta” e pela fotossensibilidade
Lúpus cutâneo crônico	Lúpus discoide (lesão cutânea que costuma deixar cicatrizes, incluindo alopecia irreversível)
Úlceras orais ou nasais	As úlceras mucosas no LES são indolores
Alopecia não fibrótica	Alopecia não discoide, reversível com o controle da atividade da doença
Doença articular	Artralgia ou artrite não erosiva
Serosite	A pleurite e a pericardite são manifestações comuns no LES
Nefrite	Representada pelos achados de proteinúria > 500 mg/dia ou Presença de cilindros hemáticos
Sistema neurológico	Convulsão, psicose, confusão mental, neurite periférica, outros
Anemia hemolítica	O encontro de anemia de doença crônica é comum no doente lúpico. Entretanto, apenas a anemia hemolítica é critério diagnóstico
Leucopenia ou linfopenia	Leucócitos < 4.000/mL ou Linfócitos < 1.000/mL

Trombocitopenia	Plaquetas < 100.000/mL
CRITÉRIOS IMUNOLÓGICOS	
FAN	Presença de positividade para a pesquisa do FAN em mais de 98% dos casos
Anti-dsDNA	Boa especificidade para o LES, presente em 75% dos casos
Anti-Sm	Autoanticorpo de maior especificidade, mas presente em apenas 30% dos casos
Anticorpos Antifosfolípides	Presente em 50% dos pacientes lúpicos
Hipocomplementemia	C3 baixo, C4 baixo ou CH50 baixo
Coombs direto positivo	Teste de Coombs direto positivo

SLICC: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*; FAN: anticorpos antinucleares; Anti-dsDNA: anticorpos contra o DNA de fita dupla; C3: complemento 3; C4: complemento 4; CH50: complemento hemolítico 50%.

Fonte: adaptado de Petri et al. (2012).

Os critérios do grupo SLICC parecem ser mais sensíveis que os critérios do ACR, embora sejam menos específicos. Eles também parecem ser clinicamente mais relevantes, porque incluem mais pacientes com LES definido clinicamente que aqueles incluídos quando se usam os critérios do ACR. Os critérios do SLICC também ganham em eficácia quando comparados aos critérios do ACR e são mais consistentes com os avanços nos conceitos da patogênese do LES (PETRI et al., 2012).

Por outro lado, a avaliação da atividade da doença é crucial para as decisões de tratamento na prática clínica de rotina e também para a pesquisa, sendo necessário quantificar a mudança na atividade da doença de uma maneira que inclua todas as possíveis manifestações do LES. Vários sistemas de avaliação foram desenvolvidos e validados, incluindo o BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*), o SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*), o ECLAM (*European Community Lupus Activity Measure*) e o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*). Estes sistemas foram desenvolvidos para avaliar a atividade da doença em um determinado momento, tendo como vantagem a simplicidade, pois às características clínicas de cada órgão/sistema são atribuídas pontuações numéricas que, ao final, são somadas para dar uma pontuação total para a atividade da doença. Os pacientes podem apresentar doença inativa ou ativa, e esta última pode se apresentar como persistente, com melhora ou piora do quadro clínico. O principal problema com estes sistemas de pontuação é que os pontos são concedidos para as características clínicas, se presentes, mas não distinguem as que estão melhorando daquelas que estão se deteriorando ou se mantendo inalteradas (FELD; ISENBERG, 2014).

O principal índice de atividade atualmente utilizado no LES é o SLEDAI (anexo 1), o qual é composto por 24 itens incluindo sinais, sintomas e testes laboratoriais, cada qual recebendo um valor (que varia de 1 a 8) de acordo com sua importância ou gravidade. A sua

soma resulta num escore final que, quanto mais alto, maior o grau de atividade da doença que pode atingir, no máximo, 105 pontos (BORBA et al., 2008). Esse índice avalia a presença de manifestações clínicas e laboratoriais de atividade lúpica presentes tanto na data da avaliação quanto nos 10 dias precedentes (SILVA et al., 2008). A versão original do SLEDAI foi introduzida em 1985, sendo revista em 1992 (BOMBARDIER et al., 1992) e em 2000, recebendo, nesse ano, uma nova nomenclatura: SLEDAI-2K (anexo 2), que permite determinar doença ativa e persistente através de descritores considerados previamente no SLEDAI apenas quando ocorriam de forma inédita, como a presença de qualquer rash, alopecia ou úlceras em mucosas, e proteinúria súbita, recorrente ou persistente > 0,5 g/24hs (GLADMAN; IBÁÑEZ; UROWITZ, 2002). Outras modificações do índice SLEDAI também foram realizadas, entre elas o Mex-SLEDAI e o SELENA-SLEDAI (ANIC et al., 2014).

### **1.1.5 Manifestações clínicas**

As características patológicas básicas do LES são aquelas relacionadas à inflamação e anormalidades nos vasos sanguíneos que incluem a vasculopatia obstrutiva, vasculite e deposição de complexo imune. O envolvimento renal é uma das manifestações mais graves do LES e que, nas formas mais agressivas, pode levar à insuficiência renal crônica (MOK; LAU, 2003). No Brasil, como a luz solar está presente durante a maior parte do ano em todas as regiões do país e a quantidade de luz UV pode atingir níveis extremamente elevados, pacientes com LES apresentam alta frequência de manifestações cutâneas (VILAR; SATO, 2002). Outros sistemas orgânicos afetados pelo LES geralmente apresentam anormalidades inflamatórias ou vasculares não-específicas, embora os achados patológicos sejam, algumas vezes, mínimos. Vasculopatia obstrutiva é uma característica histológica comum associada à presença de anticorpos antifosfolípidos. A aterosclerose e o dano tecidual causado pela hipertensão, corticosteroides e outros medicamentos podem ser encontrados em pacientes com LES de longa data (MOK; LAU, 2003).

O LES é uma doença com evolução clínica imprevisível, sendo caracterizado por uma alternância entre períodos de remissão e exacerbação e por uma grande variedade de manifestações clínicas (sinais e sintomas) que podem afetar qualquer órgão. Os sinais e sintomas no LES podem ser divididos em constitucionais e orgânicos (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

Os sinais e sintomas constitucionais incluem fadiga (80% a 100% dos casos), febre (mais de 50% dos casos) e mudanças no peso, onde a perda de peso é geralmente vista antes do diagnóstico da doença, enquanto que o ganho de peso parece estar relacionado com o uso de corticosteroides utilizados no tratamento da doença. Os sinais e sintomas orgânicos incluem os musculoesqueléticos (90% dos casos), como artralgia, artrite, osteonecrose e miopatia; renal, como a nefrite; gastrointestinais; pulmonares, sendo a

pleurite a mais comum; cardiovasculares, como as lesões cardíacas valvulares e a trombose arterial e venosa; neurológicos, como convulsões e doença cerebrovascular (acidente vascular cerebral e acidente isquêmico transitório); psiquiátricos, como depressão e disfunção cognitiva; hematológicos, que incluem anemia, trombocitopenia, neutropenia e leucopenia; oculares (30% dos casos), sendo a ceratoconjuntivite seca em um ou ambos os olhos a mais comum delas e sintomas secundários à neurite do nervo óptico, os quais podem ameaçar seriamente a visão dos pacientes; cutâneos (85% dos casos), que incluem *rash* malar, lesões discoides, fotossensibilidade, alopecia (45% dos casos) e livedo reticular (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

## 1.2 Proteína C-reativa e Lupus Eritematoso Sistêmico

A PCR humana foi originalmente observada no plasma de pacientes com infecção aguda, apresentando reação com o polissacarídeo C do pneumococo em uma pesquisa realizada por Tillet e Francis durante seus estudos em pacientes com pneumonia aguda (TILLET; FRANCIS, 1930). Os pesquisadores descobriram que quando o soro de pacientes febris foi misturado a um componente da parede celular do pneumococo, o qual eles denominaram de “Fração C”, houve a formação de um precipitado. Essa propriedade foi atribuída como sendo devida a reatividade da PCR, presente em altos níveis no soro de “fase aguda” (HAGE; SZALAI, 2007).

A PCR é o protótipo de proteína de fase aguda, com marcada elevação da concentração em resposta a diversos estímulos inflamatórios. Na presença de cálcio, tem a capacidade de formar complexos que ativam a via clássica do complemento, com consequente opsonização desses substratos para posterior fagocitose (MOLD; GEWURZ; DU CLOS, 1999). Outros efeitos proinflamatórios da PCR consistem na estimulação da liberação de citocinas inflamatórias. Como efeito anti-inflamatório, parece atuar nas células endoteliais produzindo menor adesão de neutrófilos e estimulando a produção do antagonista do receptor da IL-1, sugerindo que atue como um modulador do sistema imunológico (ZOUKI et al., 1997).

O principal órgão que sintetiza a PCR é o fígado, produzida em resposta ao estímulo de citocinas proinflamatórias, como a IL-6 e IL-1 $\beta$ . A IL-6 é reconhecida como sendo a maior reguladora da PCR sanguínea (WEINHOLD; RUTHER, 1997). Essa citocina induz a resposta de fase aguda da PCR nos hepatócitos pela ação sinérgica com a IL-1 $\beta$  (RUSSELL et al., 2004; THALMAIER et al., 2006).

A PCR é um membro da família das pentraxinas, sendo composta por cinco subunidades idênticas de 206 aminoácidos, cada uma arranjada simetricamente em torno de um poro central. A molécula possui uma face de reconhecimento para ligante que pode se aderir a uma variedade de agentes biológicos, como bactérias, formando complexos

ligados a PCR. O lado oposto de cada subunidade representa uma molécula efetora que é capaz de iniciar vias de resposta mediada por efetores humorais ou solúveis da defesa do hospedeiro (por ativação do sistema complemento pela via clássica) e vias de resposta mediada por células (por ativação do sistema complemento e por ligação à porção Fc da IgG) (SHRIVE et al., 1996; VOLANAKIS, 2001).

A produção da PCR ocorre em resposta à inflamação, infecção e trauma (EKLUND; LEHTIMÄKI; HURME, 2005). Níveis séricos de PCR maiores que 10 mg/L são, geralmente, considerados indicativos de um processo infeccioso ou inflamatório agudo (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). A elevação da PCR sanguínea depois de algum insulto ou injúria tecidual é rápida e robusta, com níveis aumentando até mais de 1000 vezes acima do valor basal dentro de 24 horas (HAGE; SZALAI, 2007), o que faz da PCR um bom marcador para o diagnóstico e monitoramento de processos inflamatórios (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). A introdução da metodologia de PCR ultrasensível (usPCR), tecnologia que permite detectar baixos níveis de PCR (limiar de detecção de 0,175 mg/L) em pessoas saudáveis, tem resultado em grande fonte de dados que associam os níveis séricos de PCR a vários tipos de doenças (BASSUK; RIFAI; RIDKER, 2004).

Uma das funções da PCR consiste em sua capacidade de se ligar à cromatina (ROBEY et al., 1984), histonas (DU CLOS; ZLOCK; RUBIN, 1988) e células apoptóticas (GERSHOV et al., 2000), promovendo a remoção de células mortas com potencial imunogênico. Acredita-se que tais características da PCR contribuem para sua habilidade em modificar o fenótipo de doenças autoimunes por promover a remoção de células necróticas e apoptóticas e por recrutar proteínas do sistema complemento e vias efetoras mediadas por receptores Fc (SZALAI, 2004). Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a PCR reconhece tanto patógenos estranhos como células do hospedeiro danificadas e pode iniciar sua eliminação por interagir com sistemas efetores humorais e celulares no sangue (KILPATRICK; VOLANAKIS, 1991). No hospedeiro, o aumento do *clearance* de células apoptóticas e seus conteúdos nucleares derivados de células fagocíticas via opsonização da PCR pode prevenir o desenvolvimento de uma resposta autoimune antígeno nuclear-específica (GERSHOV et al., 2000; CARROLL, 2001). Portanto, a habilidade da PCR em prevenir a autoimunidade pode vir de sua capacidade em prevenir a ativação de células B autorreativas, promovendo o *clearance* de sítios que apresentam autoantígenos (SZALAI, 2004).

De acordo com Volanakis e Wirtz (1979) e Du Clos (1989), a PCR liga-se a constituintes específicos da membrana (fosfolípidos polares) e material nuclear (pequenas ribonucleoproteínas nucleares), os maiores autoantígenos no LES, liberados durante a morte celular ou expostos na superfície da célula durante a apoptose. Caracteristicamente, no LES humano há uma relativa falência na resposta de fase aguda da PCR durante a

doença ativa apesar da evidente inflamação tecidual (PEPYS; LANHAM; DE BEER, 1982). Quando níveis elevados de PCR são detectados, eles são muito mais indicativos de uma infecção intercorrente do que de um LES ativo (LINARES et al., 1986; RUSSELL et al., 2004; JONSEN et al., 2007; SHIH et al., 2008). Alguns estudos (BECKER et al., 1980; MORROW et al., 1981; ROY; TAN, 2001) têm mostrado que os níveis de PCR em pacientes com LES estão pouco elevados tanto na ausência quanto na presença de infecção.

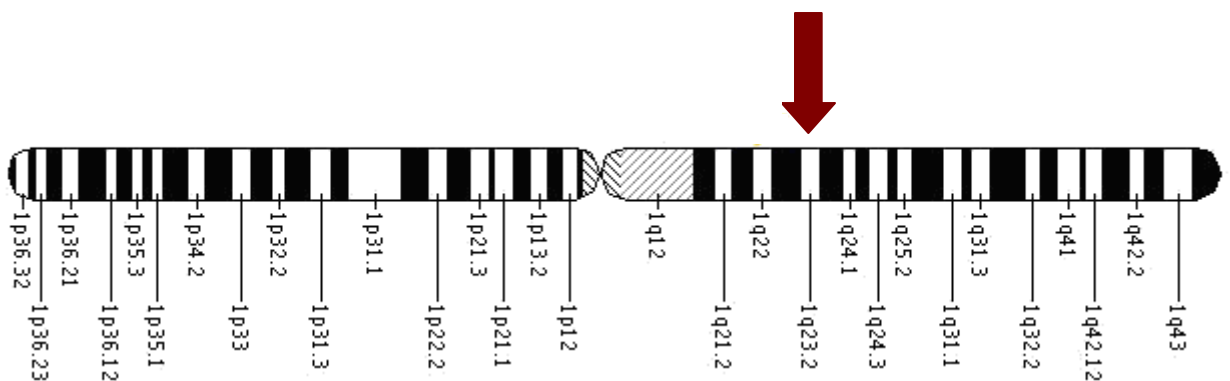
Estudos têm mostrado que o valor em se usar a PCR para monitorar a atividade da doença no LES tem permanecido controverso devido à inconsistente correlação entre a PCR circulante e a atividade da doença (BERTOUCH et al., 1983; LINARES et al., 1986; BARNES et al., 2005). No entanto, o padrão de elevação anormal da PCR em pacientes com LES produziu a primeira evidência clínica de que a variação na PCR pode contribuir para a patogênese do LES (SHIH et al., 2008).

Evidências sugerem que os níveis séricos de PCR são controlados de uma maneira complexa e influenciados por fatores clínicos e genéticos (CARLSON et al., 2005). Alguns fatores, como a presença de infecções, podem contribuir para variações no nível basal da PCR (KUSHNER; RZEWNICKI; SAMOLS, 2006), assim como o índice de massa corporal (IMC), a terapia de reposição hormonal, uso de estatinas (LEDUE; RIFAI, 2003) e a resistência à insulina, embora essa alteração parece ser dependente do IMC (ADABIMOHAB et al., 2016). De acordo com Yan et al. (2007), os níveis de PCR parecem estar aumentados também em usuários de álcool. Um estudo de Kathiresan et al. (2006) mostrou que covariáveis clínicas como idade, sexo, IMC, terapia de reposição hormonal, tabagismo, relação entre a lipoproteína de alta densidade do colesterol (HDL) e colesterol total, hipertensão arterial, uso de estatinas, prevalência de doença cardiovascular e níveis séricos de triglicerídeos são responsáveis por cerca de 26% na variação sérica da PCR. Os autores também mostraram que apenas o IMC é capaz de explicar 15% da variação total nos níveis de PCR. Um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que os níveis séricos de PCR determinados por método ultrasensível foram mais elevados em mulheres, entre os mais idosos e nos indivíduos com  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$  (DELONGUI et al., 2013).

Em adição às variáveis ambientais, aos hábitos de vida dos pacientes e aos fatores clínicos, há um adicional e substancial componente genético que influencia os níveis de PCR. No entanto, a extensão do quanto as variáveis clínicas e genéticas, em conjunto, são responsáveis pela variação total no nível sérico de PCR é incerta (KATHIRESAN et al., 2006). Uma hereditariedade moderada nos níveis de PCR tem sido relatada em estudos familiares com gêmeos, sugerindo que os fatores genéticos podem contribuir entre 25% a 40% na variação total nos níveis plasmáticos dessa proteína (PANKOW et al., 2001; RETTERSTOL; EIKVAR; BERG, 2003; MACGREGOR et al., 2004). Um estudo realizado

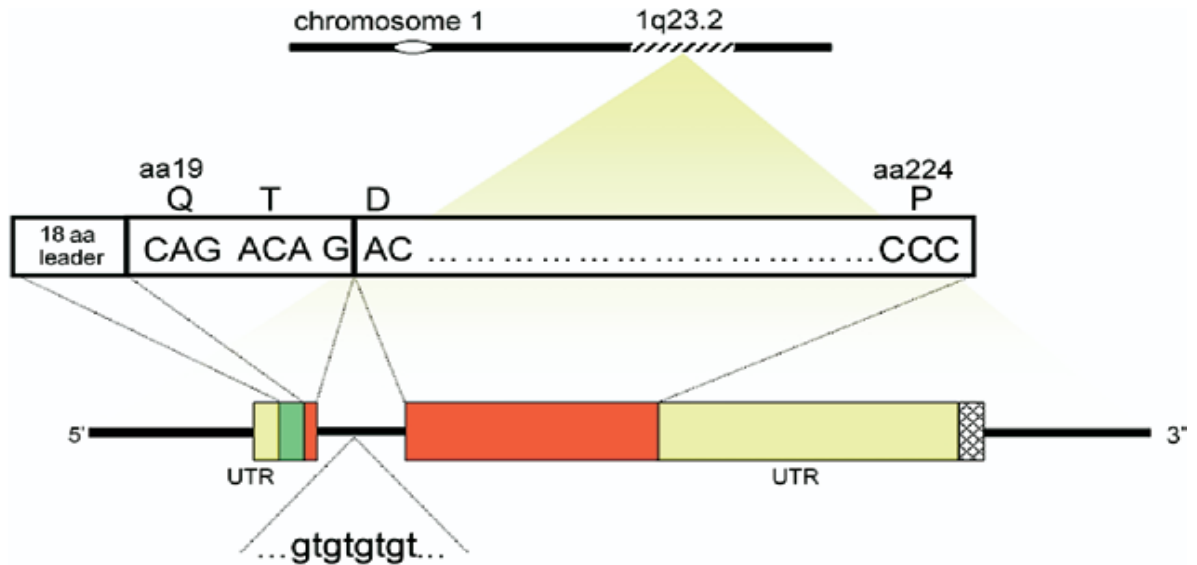
com 2163 indivíduos provenientes de uma grande variedade de famílias encontrou que fatores genéticos compartilhados eram responsáveis por cerca de 40% das variações nos níveis da PCR (PANKOW et al., 2001). Em outro estudo (DUPUIS et al., 2005), a hereditariedade estimada para os níveis de PCR variou de 27% a 40%, sugerindo um papel importante na variação da sequência de DNA (com a presença de vários polimorfismos) como determinante nos níveis séricos dessa proteína.

Polimorfismos no gene *PCR* e em genes que controlam a sua expressão influenciam os níveis dessa proteína (EKLUND; LEHTIMÄKI; HURME, 2005; THALMAIER et al., 2006; ARENILLAS et al., 2009). O gene *PCR* localiza-se no braço longo do cromossomo 1 humano, na região denominada 1q23.2 (FLOYD-SMITH et al., 1986; WALSH; DIVANE; WHITEHEAD, 1996). É composto por aproximadamente 2000 pares de bases (pb) e por um íntron separando dois éxons (LEI et al., 1985; WOO; KORENBERG; WHITEHEAD, 1985). O grupo conduzido por Woo, Korenberg e Whitehead (1985) descobriu que o gene *PCR* possui uma região não transcrita (3'-UTR) desproporcionalmente longa, sugerindo um possível papel regulatório para essa sequência. O primeiro éxon codifica um peptídeo sinal e os dois primeiros aminoácidos da proteína madura. Isso é seguido por um íntron composto por 278 nucleotídeos de comprimento, o qual inclui uma sequência em repetição GT. O segundo éxon codifica os 204 aminoácidos restantes da proteína madura e é seguido por um códon de parada (H B6AGE; SZALAI, 2007). A figura 2 mostra a localização do gene *PCR* no cromossomo 1 humano. A figura 3 mostra a constituição do gene *PCR*.



**Figura 2:** Esquema representativo do cromossomo 1 humano. A seta indica a região 1q23.2 presente no braço longo do cromossomo 1 onde o gene que codifica a proteína C-reativa encontra-se mapeado.

Fonte: adaptado de Jorge (2011).



**Figura 3:** Constituição do gene da proteína C-reativa (PCR). O gene *PCR* está localizado no cromossomo 1 humano e é composto por 2 éxons (caixas vermelhas e verde) separados por um único íntron que apresenta uma região com repetição dinucleotídica (gt). O éxon 1 codifica um peptídeo sinal com 18 aminoácidos (caixa verde) e os 2 primeiros aminoácidos da proteína madura (caixa vermelha menor). O éxon 2 codifica os 204 aminoácidos restantes da proteína madura (caixa vermelha maior) e é seguido por um códon de parada. UTR = regiões não transcritas (caixas amarelas).

Fonte: Hage e Szalai (2007).

### 1.2.1 Polimorfismos no gene *PCR* associados ao LES

Uma variedade de mutações pode ocorrer no DNA, algumas das quais levam a uma mudança na função ou produção do produto gênico (WATERER; WUNDERINK, 2003). O polimorfismo genético é definido como a presença de um alelo variante (raro) que existe de forma estável na população em uma frequência que não pode ser explicada por novas mutações (geralmente maior que 1%). O tipo mais comum de polimorfismo que pode ocorrer é a troca (inserção, deleção ou substituição) de um nucleotídeo por outro, conhecido como SNP (*single-nucleotide polymorphism*), o qual pode aparecer aproximadamente a cada 300 ou 500 bases do DNA humano (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003). Polimorfismos que ocorrem em um éxon podem levar a uma alteração na estrutura da proteína codificada pelo gene, enquanto que aqueles que ocorrem na região promotora podem alterar a ligação dos fatores de transcrição ativadores ou supressores alterando, assim, a taxa de transcrição do gene. Polimorfismos que ocorrem nos íntrons, reconhecidos como regiões importantes na regulação gênica, podem afetar a regulação dos genes, particularmente quando ocorrem próximos à fronteira ou ao limite íntron – éxon (WATERER; WUNDERINK, 2003).

As diferentes nomenclaturas dos SNPs dificultam o reconhecimento do tipo de polimorfismo genético e a comparação dos resultados obtidos sobre as associações entre as variantes genéticas e doenças. Inicialmente, os SNPs eram identificados pelo nome da enzima de restrição que reconhece ou não o sítio polimórfico do DNA após amplificação pela reação em cadeia da polimerase. Era comum na literatura genética encontrar SNPs nomeados pela enzima e pelo gene clivado. Como exemplo, tem-se o SNP *NcoI* do gene *TNF-β*. Como rapidamente se tornou visível que, frequentemente, sítios múltiplos dentro de um mesmo gene poderiam ser clivados pela mesma enzima de restrição, essa nomenclatura foi abandonada em favor do uso da localização da base polimórfica em relação ao início do sítio de transcrição para o gene (como *PCR-757*, *PCR-286*, *PCR+1059* e *PCR+1444*, por exemplo). Essa nomenclatura dominou a literatura por cerca de uma década. Infelizmente, diferenças no cálculo para o sítio inicial da transcrição para cada gene ainda dificultavam a interpretação dos resultados (RELLO; RESTREPO, 2008).

Outro problema em relação à nomenclatura dos polimorfismos genéticos é a classificação dos alelos individuais. Convencionou-se que o alelo mais comum nos estudos populacionais era denominado de alelo 1 ou A e o segundo alelo mais comum era o alelo 2 ou B. Como as frequências alélicas podem variar significativamente entre populações, tal nomenclatura parece, também, não ser adequada. Como muitos polimorfismos estão sendo descritos, a prática aceita para indicar o nome exato de cada polimorfismo é a referência à sequência numérica presente no banco de dados do *National Institute of Health* (NIH) (RELLO; RESTREPO, 2008). Nessa proposta, os polimorfismos *PCR+1059GC* e *PCR+1444CT* são, oficialmente, conhecidos como rs1800947 e rs1130864, respectivamente.

Atualmente, novas nomenclaturas surgiram na tentativa de uniformizar a identificação das variantes genéticas. Segundo o *Human Genome Variation Society*, afiliada à Federação Internacional das Sociedades de Genética Humana e à Organização do Genoma Humano, uma das recomendações para a nomenclatura se baseia na localização da base polimórfica a partir da base inicial do gene. Nesse caso, por exemplo, o polimorfismo rs1800947 (*PCR+1059GC*) é denominado como g.5942G>C, enquanto o rs1130864 (*PCR+1444CT*) é chamado de g.6289C>T. Outra nomenclatura se baseia na localização da base polimórfica a partir do códon inicial. Nesse caso, o polimorfismo rs1800947 é denominado como c.552G>C, enquanto o rs1130864 é chamado de c.\*224C>T. Assim, de acordo com as diferentes recomendações, alguns polimorfismos no gene *PCR* são denominados como apresentado no Quadro 2.

**Quadro 2:** Nomenclatura dos polimorfismos de um único nucleotídeo no gene da Proteína C-reativa, de acordo com as recomendações de diferentes instituições.

Localização da base polimórfica em relação ao início do sítio de transcrição para o gene	Referência à sequência numérica presente no banco de dados do NIH	Localização da base polimórfica a partir da base inicial do gene, segundo a HGVS	Localização da base polimórfica a partir do códon inicial, segundo a HGVS
-757TC	rs3093059	g.4244T>C	c.-861T>C
-717AG	rs2794521	g.4284A>G	c.-821A>G
-286CTA	rs3091244'T'	g.4715C>T	c.-390C>T
-286CTA	rs3091244'A'	g.4715C>A	c.-390C>A
IVS +29AT	rs1417938	g.5194A>T	c.61+29A>T
+1059GC	rs1800947	g.5942G>C	c.552G>C
+1444CT	rs1130864	g.6289C>T	c.*224C>T
+1846GA	rs1205	g.7147G>A	c.*1082G>A

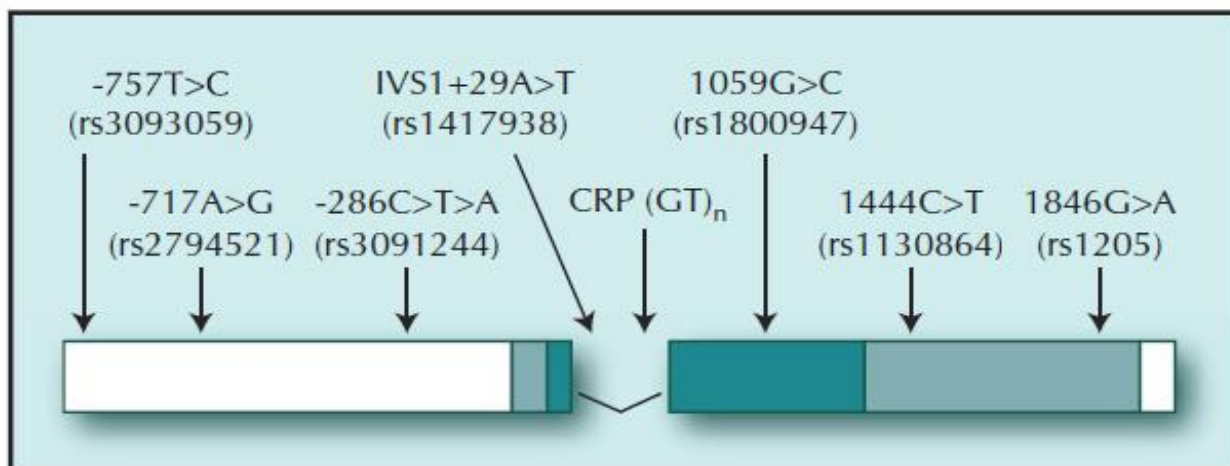
NIH: *National Institute of Health*; HGVS: *Human Genome Variation Society*; A: adenina; T: timina; C: citosina; G: guanina; rs: *reference sequence*; g: *gene*; c: *codon*.

Fonte: adaptado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Acesso em 18/04/2016.

Hage e Szalai (2007) mostraram que essa variedade de polimorfismos no gene *PCR* está estatisticamente associada aos níveis sanguíneos dessa proteína e que, certamente, alguns deles são responsáveis por alterar os níveis sanguíneos da PCR. Os SNPs representam uma variação muito comum no gene *PCR* (RHODES et al., 2010) e cada um deles parece afetar os níveis séricos de PCR de maneira diferente, avaliados em diversas doenças (ZEE; RIDKER, 2002; BRULL et al., 2003; RUSSELL et al., 2004). Enquanto alguns foram associados com aumento nos níveis séricos de PCR, como os rs3093059, rs3091244'T', rs3091244'A', rs1417938 e rs1130864, outros foram associados com menores níveis basais de PCR, como os rs1800947 e rs1205. Além destes, o polimorfismo rs2794521 parece não alterar os valores séricos dessa proteína (DANIK; RIDKER, 2007).

A figura 4 ilustra a localização de cada SNP no gene *PCR*, revisados por Danik e Ridker (2007). O polimorfismo rs1800947 encontra-se localizado na região do éxon 2 e caracteriza-se pela substituição de uma guanina por uma citosina na sequência do DNA, mas que não altera o aminoácido sintetizado (CTG→CTC, Leu→Leu) (CAO; HEGELE, 2000). O mecanismo molecular que explica como essa mutação silenciosa poderia modular os níveis séricos de PCR permanece não estabelecido (EKLUND; LEHTIMÄKI; HURME, 2005). O SNP rs1130864 localiza-se na região 3'UTR do gene, sendo caracterizado pela substituição de uma citosina por uma timina na sequência do DNA e, por encontrar-se em

uma região não codificadora, não altera a estrutura da proteína sintetizada, mas pode estar relacionado com a regulação da expressão da PCR através da estabilidade do RNA mensageiro produzido (YAN et al., 2007). Em um estudo de revisão conduzido por Danik e Ridker (2007), o SNP rs1800947 esteve associado com menores níveis séricos de PCR, enquanto o SNP rs1130864 mostrou-se associado com elevados níveis séricos dessa proteína.



**Figura 4:** Localização dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene da proteína c-reativa (PCR) presente no cromossomo 1 humano. O gene *PCR* consiste de dois éxons (caixas verdes) separados por um único íntron. As regiões de codificação dos éxons 1 e 2 (caixas verdes) correspondem a um peptídeo de 206 aminoácidos separados pelo íntron que contém regiões de microssatélites com repetição (GT)<sub>n</sub>. Uma região 5'-não transcrita curta (104 pares de base) e uma região 3'-não transcrita relativamente longa (1,2kb) flanqueiam o gene (caixas cinzas). As regiões promotoras também estão presentes (caixas brancas). Os SNPs estão identificados de acordo com a nomenclatura comumente referenciada na literatura e, entre parênteses, de acordo com o identificador dbSNP incluído para referência no banco de dados SNP do Centro Nacional de Biotecnologia (dbSNP).

Fonte: Danik e Ridker (2007).

Em um estudo realizado em duas grandes coortes totalizando 586 amostras de famílias inglesas com LES, Russell et al. (2004) analisaram a relação entre quatro SNPs no gene *PCR* (rs3091244, rs1800947, rs1130864 e rs1205) e polimorfismos no comprimento da sequência intrônica (GT)<sub>n</sub> com os níveis séricos de PCR. Os resultados mostraram que níveis basais reduzidos de PCR foram independentemente influenciados pelos polimorfismos rs1800947 e rs1205. Além disso, o alelo A do SNP rs1205 foi associado com a susceptibilidade ao LES, com a produção de autoanticorpos antinucleares e com as menores médias nos níveis séricos de PCR. Os resultados sugerem haver também uma

associação entre o polimorfismo rs1800947 e o LES, já que o alelo C desse SNP foi associado com uma expressão reduzida de PCR basal, predispondo ao desenvolvimento de LES. Tais dados suportam a hipótese de que uma limpeza defeituosa de material potencialmente imunogênico, indicada pelos baixos níveis basais de PCR, poderia ser um fator que contribuiria para a patogênese da doença.

Jonsen et al. (2007) estudaram a relação entre as manifestações clínicas do LES com os SNPs rs1800947 e rs1205 no gene *PCR*. Os autores analisaram uma coorte com 323 pacientes com LES da Suécia composta por 39 homens e 284 mulheres e 200 doadores de sangue saudáveis foram usados como controles (100 homens e 100 mulheres). Os resultados do estudo sugerem uma associação entre a nefrite lúpica com a presença do alelo A do polimorfismo rs1205, caracterizado por níveis baixos de PCR. Uma possível explicação para essa associação seria a capacidade reduzida do *clearance* de células apoptóticas e complexos imunes em pacientes com esse alelo. Entretanto, o alelo A foi associado com uma frequência reduzida de artrite, o qual talvez pudesse refletir que caminhos patogênicos diferentes estariam operando tanto na artrite quanto na nefrite.

Um trabalho realizado por Shih et al. (2008) em mulheres norte-americanas caucasianas (337 com LES e 448 saudáveis) avaliou a associação entre os SNPs rs3093059, rs3091244, rs1417938, rs1800947 e rs1205 no gene *PCR* com os níveis séricos dessa proteína e com a susceptibilidade ao LES. As frequências genotípicas e alélicas não foram significativamente diferentes entre casos e controles em nenhum dos cinco SNPs examinados individualmente. Para verificar a somatória de efeitos dos diferentes SNPs, oito haplótipos (Ht) [Ht1(TCAGG), Ht2(TCAGA), Ht3(TCACA), Ht4(TTTGG), Ht5(TTTGA), Ht6(TAAGG), Ht7(CCAGG) e Ht8(CAAGG)] foram avaliados e todos apresentaram uma frequência igual ou superior a 2% em ambos os grupos casos e controles; o Ht5(TTTGA) pareceu ser o mais significativo para a susceptibilidade ao LES, enquanto os Ht2(TCAGA), Ht4(TTTGG) e Ht8(CAAGG) pareceram ser protetores para a doença. O estudo observou que pacientes com LES que possuíam o genótipo GC do rs1800947 exibiram níveis mais elevados de C4 quando comparados aos indivíduos GG do mesmo polimorfismo. Pacientes com genótipo TT do polimorfismo rs1417938 apresentaram níveis mais elevados de PCR quando comparados aos indivíduos com os genótipos AA e AT do mesmo polimorfismo. Os SNPs rs3093059, rs1800947 e rs1205 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis circulantes de PCR. Segundo os autores, a falta de associação pode ser atribuída ao limitado tamanho da amostra dos indivíduos portadores dos alelos raros, ou os efeitos foram mascarados por confundidores, como os medicamentos anti-inflamatórios que pacientes com LES usam regularmente, os quais poderiam alterar os níveis séricos de PCR. Os dados do estudo sugerem que somente combinações entre variantes genéticas no gene *PCR* podem modificar a susceptibilidade ao desenvolvimento

de LES e influenciarem os níveis de PCR circulantes. Além disso, os SNPs parecem não atuar através de uma única maneira, mas podem exercer seus efeitos em diferentes vias de atividade ou interação com outras proteínas.

Kim et al. (2009) analisaram seis SNPs no gene *PCR* (rs3093059, rs2794521, rs3091244, rs1800947, rs1130864 e rs1205) com a susceptibilidade à doença e manifestações clínicas do LES em 148 pacientes coreanos e 137 indivíduos controles. Os resultados mostraram não haver associação entre os polimorfismos rs1800947 e rs1130864 com os níveis séricos de PCR e com a susceptibilidade ao LES, embora o alelo T do SNP rs1130864 tenha sido associado com a ocorrência de trombocitopenia nos pacientes lúpicos. Entretanto, a frequência dos genótipos contendo os alelos A ou T do polimorfismo trialélico rs3091244 foi significativamente maior em pacientes com LES quando comparada com os controles. Além disso, pacientes portadores dos alelos A ou T apresentaram níveis basais maiores de PCR que aqueles que possuíam o genótipo homozigoto CC. O estudo concluiu que esse polimorfismo desempenha um papel importante na susceptibilidade ao LES pela regulação dos níveis séricos de PCR e, ao contrário dos estudos mencionados anteriormente nesse item, os resultados sugerem que níveis basais elevados de PCR possam ser importantes na patogênese dessa doença.

Diante desse cenário, fica evidente a importância de SNPs no gene *PCR* que possam estar envolvidos na variabilidade dos níveis séricos da PCR e na susceptibilidade genética ao LES, o que os tornam atraentes candidatos no estudo da fisiopatologia da doença.

### 1.3 Justificativas

O presente estudo apresenta as seguintes justificativas:

- O gene *PCR* localiza-se mapeado na região 1q23-24, que se acredita ser uma das responsáveis pela susceptibilidade genética ao LES;
- O aumento do *clearance* de células apoptóticas e seus conteúdos nucleares por células fagocíticas via opsonização da PCR pode prevenir o desenvolvimento de uma potencial resposta autoimune específica contra antígenos nucleares;
- Existem resultados contraditórios na literatura sobre o papel dos polimorfismos no gene *PCR* e a susceptibilidade ao LES, assim como existem resultados contraditórios sobre como esses polimorfismos podem alterar os níveis séricos de PCR;

- Não existem estudos prévios que avaliam a frequência dos polimorfismos no gene *PCR* na população brasileira em geral;
- A importância de identificação de um marcador genético associado ao desenvolvimento do LES bem como à evolução clínica da doença que possa contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença e no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que levem em consideração o perfil genético destes pacientes.

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a associação entre os polimorfismos rs1130864 e rs1800947 no gene *PCR* e a susceptibilidade genética ao LES, marcadores de atividade da doença e níveis séricos de PCR em pacientes atendidos no Ambulatório de Especialidades em Reumatologia do HU da UEL, Londrina, Paraná.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a frequência dos polimorfismos rs1800947 e rs1130864 do gene *PCR* entre os pacientes com LES *versus* os controles livres da doença;
- Verificar se há diferença entre os níveis séricos da PCR e de outros marcadores inflamatórios entre pacientes com LES comparados aos controles livres da doença;
- Avaliar se há associação entre os genótipos dos dois polimorfismos propostos com os níveis séricos da PCR, marcadores inflamatórios e de atividade da doença em pacientes com LES.

### **3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Ética e Consentimento**

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CAAE: 0186512.0.0000.5231, Parecer CEP n. 210.328, de 04/03/2013, Anexo 3) da UEL, e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos incluídos no estudo (apêndices 1 e 2).

#### **3.2 Delineamento**

Foi realizado um estudo caso-controle e transversal no período de 2009 a 2015.

#### **3.3 Locais de Realização do Estudo**

- Setores de Imunologia Clínica e de Diagnóstico Molecular do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU da UEL;
- Ambulatório de Especialidades em Reumatologia do HU da UEL;
- Hemocentro Regional de Londrina.

#### **3.4 População de Estudo**

A população do estudo foi constituída pelos pacientes com LES, diagnosticados de acordo com os critérios para LES do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (HOCHBERG, 1997; PETRI et al., 2012) provenientes do Ambulatório de Especialidades em Reumatologia do HU da UEL, Estado do Paraná, Sul do Brasil. Foram inseridos também, doadores de sangue saudáveis provenientes da mesma região dos pacientes com LES, recrutados do Hemocentro Regional de Londrina durante o mesmo período. Nenhum dos indivíduos inseridos no estudo apresentava sinais ou sintomas sugestivos de inflamação e/ou infecção no momento da coleta das amostras biológicas, como calor, dor, edema, hiperemia, febre, linfadenopatia, entre outros.

#### **3.5 Amostragem**

A amostra foi de conveniência e obtida de forma seriada entre o período de 2009 a 2015. A participação foi voluntária com o consentimento dos indivíduos, quando possível, ou de seus familiares ou responsáveis. Para a inclusão dos indivíduos no estudo, foram considerados os critérios de inclusão e exclusão para os grupos analisados.

#### **3.6 Critérios de Inclusão Para o Grupo de Pacientes**

- Indivíduos de ambos os sexos e com idade acima de 18 anos;
- Possibilidade de assinatura do TCLE pelo paciente, familiar ou responsável;

- Diagnóstico de LES de acordo com os critérios propostos pelo ACR (HOCHBERG, 1997; PETRI et al., 2012).

### 3.7 Critérios de Exclusão Para o Grupo de Pacientes

- Foram excluídos pacientes com LES que apresentaram processos inflamatórios e/ou infecciosos intercorrentes determinados clínica e/ou laboratorialmente.

### 3.8 Critérios de Seleção Para o Grupo de Doadores de Sangue

A seleção dos indivíduos que constituíram o grupo de doadores de sangue obedeceu ao seguinte critério:

- Resultado não reagente para todos os testes sorológicos realizados na triagem de doadores de sangue, como na pesquisa de anticorpos contra o HIV 1/2 (anti-HIV 1/2), anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV), antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs), anticorpos contra o antígeno *core* do vírus da hepatite B (anti-HBc), anticorpos contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II (anti-HTLV I/II), anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e teste não treponêmico ou treponêmico para sífilis (VDRL ou quimioluminescência para pesquisa de IgG anti-*Treponema pallidum*, respectivamente).

Nenhum dos controles inseridos no estudo apresentava sinais ou sintomas sugestivos de inflamação e/ou infecção como descrito no item 3.4.

### 3.9 Amostra

#### 3.9.1 Pacientes

Foram inseridos 183 pacientes com diagnóstico de LES de acordo com os critérios propostos pelo ACR/SLICC (HOCHBERG, 1997; PETRI et al., 2012) atendidos no Ambulatório de Especialidades em Reumatologia do HU da UEL durante o período do estudo e que obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão. A atividade da doença foi determinada pelos critérios estabelecidos pelo SLEDAI. Dois estágios foram considerados como funcionais no score SLEDAI: LES inativo quando SLEDAI < 6 e LES ativo quando SLEDAI ≥ 6 (BOMBARDIER et al., 1992).

#### 3.9.2 Controles

Como controles livres de LES, foram inseridos 138 doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina que procuraram a unidade hemoterápica durante o período de estudo e que obedeceram aos critérios de seleção para o grupo de doadores de sangue.

### 3.10 Dados Demográficos, Clínicos e Laboratoriais

Os dados demográficos e clínicos foram obtidos com a aplicação de questionário padrão pelos pesquisadores do projeto que este estudo está vinculado (Apêndices 3 e 4) e pela consulta aos prontuários médicos do HU/UEL. Medidas antropométricas, como o peso corporal (determinado por balança eletrônica, com os indivíduos usando roupas leves e sem sapatos) e altura (medida usando um estadiômetro) foram avaliados. O IMC foi calculado como o peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. A etnia foi autodeclarada como sendo caucasiana ou não caucasiana (BRAZIL, 2011).

As amostras de sangue periférico foram coletadas com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e sem anticoagulante após 12 horas de jejum. Todas as amostras foram imediatamente centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (r.p.m.) durante 15 minutos e as alíquotas de *buffy-coat* foram mantidas à temperatura de -20°C, enquanto as alíquotas de plasma e soro foram estocadas em -80°C para análises posteriores de acordo com os respectivos protocolos.

### 3.11 Polimorfismos no Gene da Proteína C-reativa

#### 3.11.1 Extração do DNA

A extração do DNA genômico a partir do *buffy-coat* de ambos os grupos foi realizada utilizando o método de separação em coluna com reagentes comercialmente disponíveis (*Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brasil*), segundo as instruções do fabricante.

A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando-se 5 µL da amostra de DNA extraído e 5 µL do corante xileno cianol (X-C). A eletroforese foi realizada a 100 V, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x (*Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Após a corrida de 45-60 minutos, o gel foi submerso em uma cuba com tampão TAE 1x (*Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) contendo brometo de etídio (20 mg/mL) por 20 minutos e a imagem do gel foi capturada e armazenada pelo sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (*Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil*). Em cada eletroforese realizada, foi incluído um controle de DNA, com concentração de 100 ng/µL, para análise comparativa com o DNA das amostras do estudo.

#### 3.11.2 Reação em cadeia da polimerase

Diferentes condições de reação para a metodologia da reação em cadeia da polimerase foram avaliadas como a concentração do DNA molde, a temperatura de hibridização dos *primers*, concentração e volume dos reagentes como dNTP, MgCl<sub>2</sub> e Taq

DNA polimerase. A temperatura de *melting*/anelamento esperada para cada conjunto de *primers* utilizados nos dois diferentes polimorfismos estudados (rs1800947 e rs1130864) foi obtida de acordo com o seguinte cálculo, levando-se em conta a quantidade de bases que compõem os *primers* utilizados:

$$T_{mPx} = 2 (A+T) + 4 (C+G)$$

Onde:

$T_m$  = temperatura de *melting*/anelamento para o *primer* analisado;

A = quantidade de adenina presente no *primer*;

T = quantidade de timina presente no *primer*;

C = quantidade de citosina presente no *primer*;

G = quantidade de guanina presente no *primer*.

Essa temperatura é obtida para cada um dos dois *primers* utilizados e a temperatura de anelamento final que foi testada na metodologia da reação em cadeia da polimerase é obtida através da seguinte fórmula:

$$T_{\text{final}} = T_{mP1} + T_{mP2} / 2 \pm 5$$

Onde:

$T_{\text{final}}$  = temperatura de *melting*/anelamento final;

$T_{mP1}$  = temperatura de *melting*/anelamento obtida para o *primer* 1 (*sense*);

$T_{mP2}$  = temperatura de *melting*/anelamento obtida para o *primer* 2 (*antisense*).

### 3.11.3 Reação em cadeia da polimerase para o polimorfismo rs1800947

Para o polimorfismo rs1800947, a temperatura obtida de acordo com o cálculo descrito no item 3.11.2 foi de 67°C (iniciamos os testes sempre com a menor temperatura obtida no cálculo e aumentamos progressivamente até atingir a temperatura ideal), segundo demonstrado na fórmula a seguir:

$$T_{mP1} = 2 (6+8) + 4 (5+6) \rightarrow T_{mP1} = 72^\circ\text{C}$$

$$T_{mP2} = 2 (8+2) + 4 (4+9) \rightarrow T_{mP2} = 72^\circ\text{C}$$

$$T_{\text{final}} = 72 + 72 / 2 \pm 5 \rightarrow T_{\text{final}} = 67^\circ\text{C} - 77^\circ\text{C}$$

Após a realização de vários testes no laboratório com amostras do estudo, a temperatura de anelamento obtida para a reação em cadeia da polimerase para o

polimorfismo rs1800947 foi de 70°C. Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a ausência de contaminação.

Após a padronização das condições de reação, a amplificação do gene *PCR* para o polimorfismo rs1800947 foi realizada pela reação em cadeia da polimerase seguindo os protocolos descritos na literatura, com algumas modificações (CAO; HEGELE, 2000; THALMAIER et al., 2006). Os *primers* utilizados para a amplificação do fragmento de 744pb do gene *PCR* foram sintetizados de acordo com a sequência do *GenBank* número 11880.1 (THALMAIER et al., 2006), obtida em 9 de abril de 2012 (Quadro 3).

A reação em cadeia da polimerase foi realizada para um volume final de 25 µL, segundo o protocolo apresentado na Tabela 1, com a seguinte ciclagem: a) 1 ciclo de 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial; b) 37 ciclos consecutivos com o seguinte protocolo para cada ciclo: 45 segundos a 95°C para desnaturação; 45 segundos a 70°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão; c) 1 ciclo final de 10 minutos a 72°C para a etapa final de extensão. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA*). Todas as reações foram realizadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucleicos.

**Quadro 3:** Sequência do gene da proteína c-reativa com 2438 pares de base obtida no *GenBank* número M11880.1. Em destaque, a sequência do fragmento com 744 pares de bases amplificado para o polimorfismo rs1800947.

1	aataaataac	tcacattgat	ttctctggtc	tgaataaatt	ttgcttcccc	tcttcccga
61	gctctgacac	ctgccccaac	aagcaatggt	ggaaaattat	ttacatagtg	gcgcaaactc
121	ccttactgct	ttggatataa	atccaggcag	gaggaggtag	ctctaaggca	agagatctag
181	gacttctagc	ccctgaactt	tcagccgaat	acatcttttc	caaaggagtg	aattcaggcc
241	cttgatcac	tggcagcagg	acgtgaccat	ggagaagctg	ttgtgtttct	tggctctgac
301	cagcctctct	catgcttttg	gccagacagg	taagggccac	cccaggctat	gggagagttt
361	tgatctgagg	tatgggggtg	gggtctaaga	ctgcatgaac	agtctcaaaa	aaaaaaaaaa
421	aagactgtat	gaacagaaca	gtggagcatc	cttcatgggtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg
481	tgtgtgtggt	gtgtaactgg	agaaggggtc	agtctgtttc	tcaatcttaa	attctatacg
541	taagtgaggg	gatagatctg	tgtgatctga	gaaacctctc	acatttgctt	gtttttctgg
601	ctcacagaca	tgtcgaggaa	ggcttttgtg	tttcccaaag	agtcggatac	ttcctatgta
661	tccctcaaag	caccgttaac	gaagcctctc	aaagccttca	ctgtgtgcct	ccacttctac
721	acggaactgt	cctcgaccog	tgggtacagt	atthtctcgt	atgccaccaa	gagacaagac
781	aatgagattc	tcataattttg	gtctaaggat	ataggataca	gttttacagt	gggtgggtct
841	gaaatattat	tcgaggttcc	tgaagtcaca	gtagctccag	tacacatttg	tacaagctgg
901	gagtccgcct	cagggatcgt	ggagttcttg	gtagatggga	agcccagggg	gaggaagagt
961	ctgagaagg	gatacactgt	gggggcagaa	gcaagcatca	tcttggggca	ggagcaggat
1021	tccttcgggtg	ggaactttga	aggaagccag	tccttagtgg	gagacattgg	aaatgtgaac
1081	atgtgggact	ttgtgctctc	accagatgag	attaacacca	tctatcttgg	cgggcccttc
1141	agtcctaattg	tcctgaactg	gcgggcaactg	aagtatgaag	tgcaaggcga	agtgttcacc
1201	aaaccccagc	tgtggccctg	aggcccagct	gtgggtcctg	aaggtacctc	ccggtttttt
1261	acaccgcatg	ggcccacgt	ctctgtctct	ggtacctc	cc	gcttttttac
1321	tcccacgtct	ctgtctctgg	gcctttgttc	ccctatatgc	attgaggcct	gctccaccct
1381	cctcagcgcc	tgagaatgga	ggtaaagtgt	ctggctctggg	agctcgtaa	ctatgctggg
1441	aatgggtcca	aaagaatcag	aatttgaggt	gtttgtttt	catttttatt	tcaagttgga
1501	cagatcttgg	agataatttc	ttacctaca	tagatgagaa	aactaacacc	cagaaaggag

310pb

434pb

233pb

201pb

```

1561 aaatgatggt ataaaaaact cataaggcaa gagctgagaa ggaagcgctg atcttctatt
1621 taattcccca cccatgaccc ccagaaaagca ggagcattgc ccacattcac agggctcttc
1681 agtatcagaa tcaggacact ggccaggtgt ctggtttggg tccagagtgc tcatcatcat
1741 gtcatagaac tgctgggccc aggtctcctg aaatgggaag cccagcaata ccacgcagtc
1801 cctccacttt ctcaaagcac actggaaagg ccattagaat tgccccagca gagcagatct
1861 gctttttttc cagagcaaaa tgaagcacta ggtataaata tgttgttact gccaagaact
1921 taaatgactg gtttttgttt gcttgacagt ctttcttaat tttatggctc ttctgggaaa
1981 ctccctccct tttccacacg aacctgtggt ggctgtgaat tctttcttca tccccgatt
2041 cccaatatac ccaggccaca agagtggacg tgaaccacag ggtgtcctgt cagaggagcc
2101 catctcccat ctccccagct ccctatctgg aggatagttg gataggtagc tgttcctagc
2161 aggaccaact acagtcttcc caaggattga gttatggact ttgggagtga gacatcttct
2221 tgctgctgga tttccaagct gagaggacgt gaacctggga ccaccagtag ccatcttggt
2281 tgccacatgg agagagactg tgaggacaga agccaaactg gaagtggagg agccaagggg
2341 ttgacaaaaca acagagcctt gaccacgtgg agtctctgaa tcagccttgt ctggaaccag
2401 atctacacct ggactgcca ggtctataag ccaataaa

```

Em amarelo: *Primer PCR+1059 (sense): 5'-GATCTGTGTGATCTGAGAAACCTCT-3'* e *Primer PCR+1059 (antisense): 5'-GAGGTACCAGAGACGACGTG-3'* (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Em azul: sítio de restrição não polimórfico para a enzima *MaeIII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)* no gene da Proteína c-reativa. Em vermelho: sítio de restrição polimórfico para a enzima *MaeIII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)* no gene da Proteína c-reativa. Em verde: alelo polimórfico.

Fonte: adaptado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/term=M11880.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/term=M11880.1). Acesso em 09/04/2012.

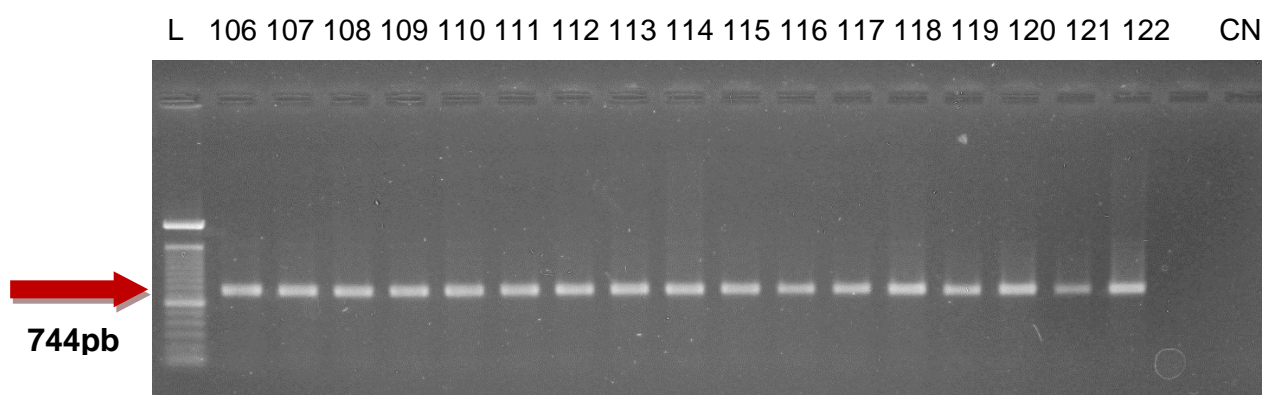
**Tabela 1:** Protocolo da reação em cadeia da polimerase para amplificação do fragmento de 744 pares de bases do gene da Proteína c-reativa, com um volume final de 25 µL.

SOLUÇÃO	VOLUME (µL)	CONCENTRAÇÃO
H <sub>2</sub> O Milli-Q estéril	14,50	
10X PCR Buffer (1,5 mM)*	2,50	0,15 mM
dNTP (1,25 mM)*	2,00	0,10 mM
<i>Primer 1 PCR+1059 – sense (2,5 mM)*</i>	1,50	0,15 mM
<i>Primer 2 PCR+1059 – antisense (2,5 mM)*</i>	1,50	0,15 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)*	0,75	1,50 mM
Taq Polimerase (5 U/µL)*	0,25	1,25 U
Amostra de DNA genômico	2,00	100 ng
Volume final	25,00	

\* *Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.*

Para a análise da amplificação do gene *PCR*, 5 µL do produto obtido na reação em cadeia da polimerase e 5 µL do corante X-C foram aplicados em gel de agarose 1%, realizada a corrida de 20 minutos (100 V) com posterior coloração do gel com brometo de etídeo e fotodocumentação no sistema L-PIX-HE (*Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil*). Em cada eletroforese foi incluído o controle negativo, com ausência de DNA (*blank*). Em cada eletroforese foi aplicado, também, 4 µL do *ladder* de 100pb (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 5 µL do corante X-C para determinar o tamanho do fragmento de DNA amplificado. Como se observa na Figura 5, todas as amostras

apresentaram banda na região correspondente a 744pb, indicando que houve a amplificação do fragmento desejado.



**Figura 5:** Análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase a partir de *primers* específicos para o polimorfismo rs1800947 no gene da Proteína C-reativa. Eletroforese em gel de agarose 1% após coloração com brometo de etídio para a visualização dos produtos de amplificação do fragmento específico com 744 pares de base em 17 amostras de doadores de sangue. L: *ladder* de DNA com 100 pb; 106 a 122 (amostras de DNA de doadores de sangue inseridos no estudo); CN: Controle Negativo ou *blank* (ausência de DNA).

#### 3.11.4 Reação em cadeia da polimerase para o polimorfismo rs1130864

Para o polimorfismo rs1130864, a temperatura obtida de acordo com o cálculo descrito no item 3.11.2 foi de 52°C, como demonstrado na fórmula a seguir:

$$TmP1 = 2(3+6) + 4(8+2) \rightarrow TmP1 = 58^{\circ}C$$

$$TmP2 = 2(2+10) + 4(4+4) \rightarrow TmP2 = 56^{\circ}C$$

$$T \text{ final} = 58 + 56 / 2 \pm 5 \rightarrow T \text{ final} = 52^{\circ}C - 62^{\circ}C$$

A temperatura de anelamento obtida para a reação em cadeia da polimerase para o polimorfismo rs1130864 foi de 56°C. Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a ausência de contaminação.

A amplificação do gene *PCR* para o polimorfismo rs1130864 foi realizada pela reação em cadeia da polimerase seguindo os protocolos descritos na literatura, com algumas modificações (YAN et al., 2007). Os *primers* utilizados para a amplificação do fragmento de 460pb do gene *PCR* foram sintetizados de acordo com a seqüência do *GenBank* número 11880.1 (YAN et al, 2007), obtida em 9 de abril de 2012 (Quadro 4).

A reação em cadeia da polimerase foi realizada para um volume final de 25  $\mu$ L, segundo o protocolo apresentado na Tabela 2, e com ciclagem como descrito no item 3.11.3, com exceção da temperatura de anelamento, que para essa reação foi de 56°C.

**Quadro 4:** Sequência do gene da Proteína C-reativa com 2438 pares de base obtida através do *GenBank* número M11880.1. Em destaque, a sequência do fragmento amplificado para o polimorfismo rs1130864.

1	aataaataac	tcacattgat	ttctctggtc	tgaataaatt	ttgcttcccc	tcttcccgaa
61	gctctgacac	ctgccccaac	aagcaatggt	ggaaaattat	ttacatagtg	gcgcaaactc
121	ccttactgct	ttggatataa	atccaggcag	gaggaggtag	ctctaaggca	agagatctag
181	gacttctagc	ccctgaactt	tcagccgaat	acatcttttc	caaaggagtg	aattcaggcc
241	cttgatcac	tggcagcagg	acgtgaccat	ggagaagctg	ttgtgtttct	tggcttgac
301	cagcctctct	catgcttttg	gccagacagg	taagggccac	cccaggctat	gggagagttt
361	tgatctgagg	tatgggggtg	gggtctaaga	ctgcatgaac	agtctcaaaa	aaaaaaaaaa
421	aagactgtat	gaacagaaca	gtggagcatc	cttcatgggtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg
481	tgtgtgtggg	gtgtaactgg	agaaggggtc	agtctgtttc	tcaatcttaa	attctatacg
541	taagtgaggg	gatagatctg	tgtgatctga	gaaacctctc	acatttgctt	gtttttctgg
601	ctcacagaca	tgtcgaggaa	ggcttttgtg	tttcccaaag	agtctggatac	ttcctatgta
661	tccctcaaag	caccgttaac	gaagcctctc	aaagccttca	ctgtgtgcct	ccacttctac
721	acggaactgt	cctcgaccgg	tgggtacagt	atthttctcgt	atgccaccaa	gagacaagac
781	aatgagattc	tcataattttg	gtctaaggat	ataggataca	gttttacagt	gggtgggtct
841	gaaatattat	tcgaggttcc	tgaagtcaca	gtagctccag	tacacatttg	tacaagctgg
901	gagtccgctt	cagggatcgt	ggagtctctg	gtagatggga	agcccagggt	gaggaagagt
961	ctgaagaagg	gatacactgt	gggggcagaa	gcaagcatca	tcttggggca	ggagcaggat
1021	tccttcgggtg	ggaactttga	aggaagccag	tccttagtgg	gagacattgg	aaatgtgaac
1081	atgtgggact	ttgtgctgtc	accagatgag	attaacacca	tctatcttgg	cggg <b>cccttc</b>
1141	<b>agtccta</b> atg	<b>tcctga</b> actg	gcggggcactg	aagtatgaag	tgcaaggcga	agtgttcacc
1201	aaaccccagc	tgtggccctg	aggcccagct	gtgggtcctg	aaggtacctc	ccggtttttt
1261	acaccgatg	ggccccacgt	ctctgtctct	ggtacctccc	gcttttttac	actgcattgt
1321	tcccagctct	ctgtctctgg	gcctttgttc	ccctatctgc	attgaggcct	gctccaccct
1381	cctcagcggc	tgagaatgga	ggtaaagtgt	ctggcttggg	agctcgtaa	ctatgctggg
1441	<b>aaatggg</b> cca	aaagaatcag	aatttgaggt	gtttgtttt	catttttatt	tcaagttgga
1501	cagatccttg	agataaatttc	ttacctcaca	tagatgagaa	aactaacacc	cagaaaggag
1561	aaatgatggt	ataa <b>aaa</b> act	<b>cataagg</b> caa	<b>gagc</b> tgagaa	ggaagcgtg	atcttctatt
1621	taattcccca	cccatgaccc	ccagaaagca	ggagcattgc	ccacattcac	agggctcttc
1681	agtatcagaa	tcaggacact	ggccagggtg	ctggtttggg	tccagagtgc	tcatcatcat
1741	gtcatagaac	tgctgggccc	aggtctcctg	aaatgggaag	cccagcaata	ccacgcagtc
1801	cctccacttt	ctcaaagcac	actggaaagg	ccattagaat	tgcccagca	gagcagatct
1861	gctttttttc	cagagcaaaa	tgaagcacta	ggtataaata	tgttgttact	gccaagaact
1921	taaagactg	gtttttgttt	gcttgcagtg	ctttcttaat	tttatggctc	ttctgggaaa
1981	ctcctcccct	tttccacacg	aaccttgtgg	ggctgtgaat	tctttcttca	tccccgatt
2041	cccaatatac	ccaggccaca	agagtggacg	tgaaccacag	ggtgtcctgt	cagaggagcc
2101	catctcccat	ctccccagct	ccctatctgg	aggatagttg	gataggtacg	tgttccctagc
2161	aggaccaact	acagtcttcc	caaggattga	ggtatggact	ttgggagtga	gacatcttct
2221	tgctgctgga	tttccaagct	gagaggacgt	gaacctggga	ccaccagtag	ccatcttgtt
2281	tgccacatgg	agagagactg	tgaggacaga	agccaaactg	gaagtggagg	agccaaggga
2341	ttgacaaaaca	acagagcctt	gaccagtggt	agtctctgaa	tcagccttgt	ctggaaccag
2401	atctacacct	ggactgcccc	ggtctataag	ccaataaa		

Em verde: *Primer PCR+1444 (sense): 5'-CCCTTCAGTCCTAATGTCC-3'* e *Primer PCR+1444 (antisense): 5'-GCTCTTGCCCTTATGAGTTTT-3'* (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Em azul: sítio de restrição polimórfico para a enzima *HpyCH4III* (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*) no gene da Proteína C-reativa. Em amarelo: alelo polimórfico.

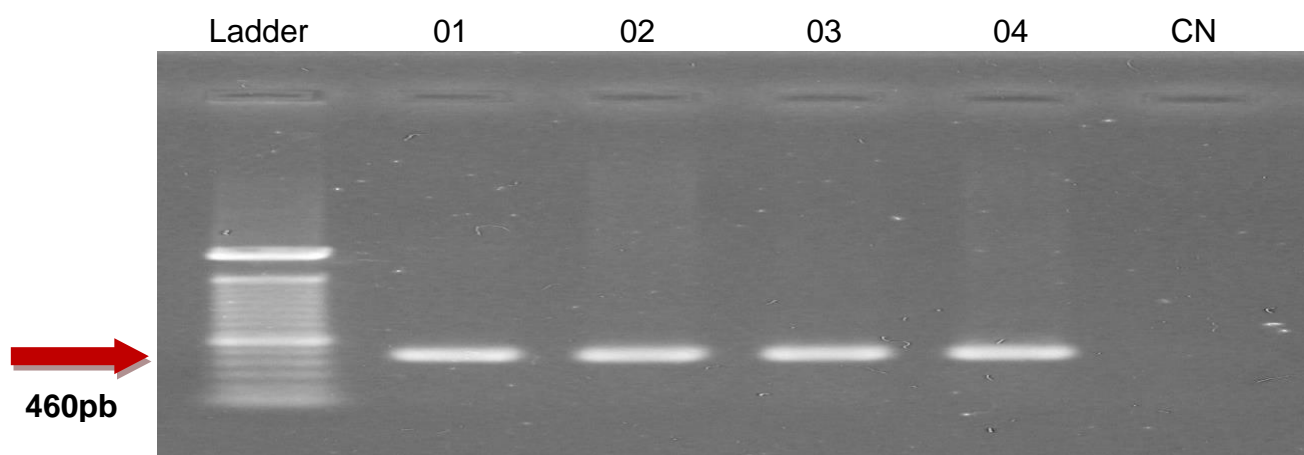
Fonte: adaptado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/term=M11880.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/term=M11880.1). Acesso em 09/04/2012.

**Tabela 2:** Protocolo da reação em cadeia da polimerase para amplificação do fragmento de 460 pares de bases do gene da Proteína C-reativa, com um volume final de 25  $\mu$ L.

SOLUÇÃO	VOLUME ( $\mu$ L)	CONCENTRAÇÃO
H <sub>2</sub> O Milli-Q estéril	14,50	
10X PCR <i>Buffer</i> (1,5 mM)*	2,50	0,15 mM
dNTP (1,25 mM)*	2,00	0,10 mM
<i>Primer 1 PCR+1444 – sense</i> (2,5 mM)*	1,50	0,15 mM
<i>Primer 2 PCR+1444 – antisense</i> (2,5 mM)*	1,50	0,15 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)*	0,75	1,50 mM
Taq Polimerase (5 U/ $\mu$ L)*	0,25	1,25 U
Amostra de DNA genômico	2,00	100 ng
Volume final	25,00	

\* *Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.*

A análise da amplificação do gene *PCR* foi realizada como descrito no item 3.11.3. Como se observa na Figura 6, todas as amostras apresentaram banda na região correspondente a 460pb, indicando que houve a amplificação do fragmento desejado.

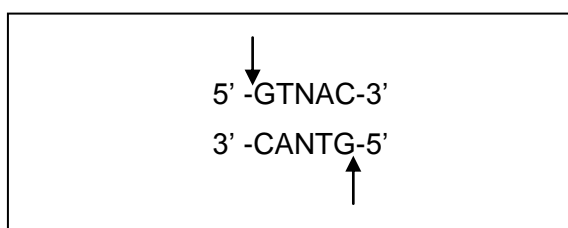


**Figura 6:** Análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase a partir de *primers* específicos para o polimorfismo rs1130864 no gene da Proteína C-reativa. Eletroforese em gel de agarose 1% após coloração com brometo de etídio para a visualização dos produtos de amplificação do fragmento específico com 460 pares de base em 4 amostras de doadores de sangue. *Ladder* de DNA com 100pb; 1 a 4 (amostras de DNA de doadores de sangue inseridos no estudo); CN: Controle Negativo ou *blank* (ausência de DNA).

### 3.11.5 Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para o polimorfismo rs1800947

Diferentes condições de reação de RFLP foram avaliadas como a concentração da enzima de restrição *MaellI* e de seu tampão de reação (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*) e o tempo de incubação a 55°C, em banho-maria, para a digestão do produto amplificado obtido na Reação em Cadeia da Polimerase. O protocolo de reação previamente descrito na literatura (THALMAIER et al., 2006) foi inicialmente avaliado neste experimento.

A enzima de restrição *MaellI* (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*) é purificada de *Methanococcus aeolicus* e tem como sítio de restrição a seguinte sequência de nucleotídeos:



A troca de bases (G→C) na sequência do gene *PCR* elimina o sítio de restrição para a enzima *MaellI* (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*). Consequentemente, o alelo que contém em sua sequência a base Guanina (G) apresenta o sítio de restrição para a enzima, enquanto que o alelo que possui a base Citosina (C) perde esse sítio de restrição.

A partir dos produtos de amplificação da reação em cadeia da polimerase, foi realizada a digestão enzimática com a enzima de restrição *MaellI* (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*) e a reação foi incubada por 4 horas a 55°C em banho-maria. A digestão enzimática seguiu o protocolo de reação descrito na Tabela 3.

**Tabela 3:** Protocolo da digestão enzimática por *MaellI* para análise do fragmento amplificado do gene da Proteína C-reativa pelo método RFLP.

SOLUÇÃO	VOLUME (µL)
2X <i>REact Buffer</i> (diluído 1:2)*	10,0
<i>MaellI</i> (5 U/µL)*	0,3 (1,5 U)
Produto de reação em cadeia da polimerase	10,0
Volume final	20,3

\* *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.*

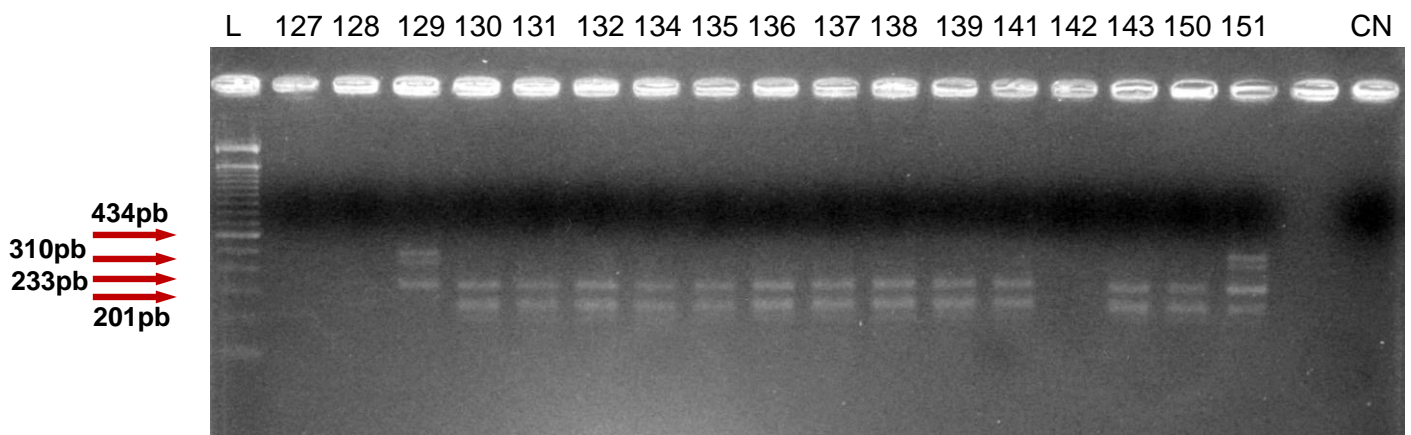
Os produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3%, aplicando-se 10 µL do produto de digestão enzimática de cada amostra e 5 µL

de corante X-C no gel para a visualização dos fragmentos formados. A eletroforese foi realizada a 70 V durante 80-90 minutos, segundo o protocolo já descrito no item 3.11.3. As bandas eletroforéticas foram visualizadas e identificadas e a imagem do gel foi capturada e armazenada pelo sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (*Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil*), o que permitiu a caracterização dos três possíveis genótipos do polimorfismo rs1800947.

Esse polimorfismo apresenta em sua sequência dois sítios de restrição para a enzima: um sítio de restrição não polimórfico (que sempre será clivado) e um sítio polimórfico (que somente será clivado quando não houver a troca da base G pela C). Com isso, o alelo G apresenta os dois sítios de clivagem (o não polimórfico e o polimórfico), formando três fragmentos de tamanhos diferentes. O alelo C apresenta somente um sítio de clivagem (o não polimórfico), formando dois fragmentos de tamanhos diferentes. Portanto, os três genótipos possíveis foram identificados da seguinte maneira:

- GG representa o genótipo na ausência de mutação e, portanto, seus dois alelos G apresentam os dois sítios de clivagem para a enzima, com a formação de três bandas eletroforéticas, com 201pb e 233pb (provenientes da clivagem do sítio polimórfico) e 310pb (proveniente da clivagem do sítio não polimórfico).
- GC representa o genótipo com mutação em heterozigose e, portanto, seu alelo G apresenta os dois sítios de clivagem para a enzima, enquanto o alelo C apresenta somente um sítio de clivagem. Nesse caso, ocorre a formação de quatro bandas eletroforéticas, com 201pb, 233pb e 310pb (provenientes da clivagem dos sítios polimórfico e não polimórfico presentes no alelo G) e 310pb e 434pb (provenientes da clivagem do sítio não polimórfico presente no alelo C). As bandas com 310pb provenientes tanto do alelo G quanto do alelo C aparecem sobrepostas no gel.
- CC representa o genótipo com mutação em homozigose e, portanto, seus dois alelos C apresentam um único sítio de clivagem para a enzima, com a formação de duas bandas eletroforéticas, com 310pb e 434pb (provenientes da clivagem do sítio não polimórfico).

A Figura 7 apresenta os resultados obtidos pela eletroforese em gel de agarose 3% após coloração com brometo de etídeo. A análise eletroforética dos produtos de digestão enzimática possibilitou a caracterização dos genótipos encontrados na população em estudo.

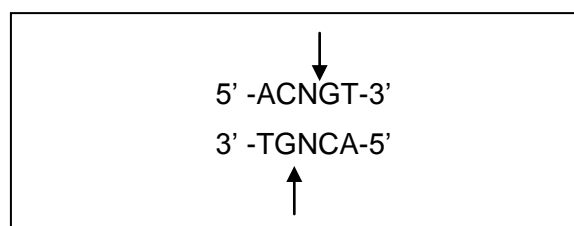


**Figura 7:** Análise dos produtos da digestão enzimática em 17 amostras de doadores de sangue. Eletroforese em gel de agarose 3% após coloração com brometo de etídeo caracterizando os três perfis genéticos após digestão com a enzima de restrição *MaeIII*. L: *ladder* de DNA com 100pb; amostra 129: genótipo CC com mutação em homozigose (presença de duas bandas, com 310 e 434pb); amostras 130, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 141, 143 e 150: genótipo homozigoto GG na ausência de mutação (presença de três bandas com 201, 233 e 310pb); amostra 151: genótipo GC com mutação em heterozigose (presença de quatro bandas com 201, 233, 310 e 434pb); CN: Controle Negativo.

### 3.11.6 Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para o polimorfismo rs1130864

Diferentes condições de reação de RFLP foram avaliadas como a concentração da enzima de restrição *HpyCH4III* e de seu tampão de reação (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*) e o tempo de incubação a 37°C, em banho-maria, para a digestão do produto amplificado obtido na reação em cadeia da polimerase. O protocolo de reação previamente descrito na literatura (YAN et al., 2007) foi inicialmente avaliado neste experimento.

A enzima de restrição *HpyCH4III* (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*) é purificada de *Helicobacter pylori* CH4 e tem como sítio de restrição a seguinte sequência de nucleotídeos:



A troca de bases (C→T) na sequência do gene *PCR* elimina o sítio de restrição para a enzima *HpyCH4III* (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*). Consequentemente, o alelo que contém em sua sequência a base Citosina (C) apresenta o sítio de restrição para a enzima, enquanto que o alelo que possui a base Timina (T) perde esse sítio de restrição.

A partir dos produtos de amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase, foi realizada a digestão enzimática com a enzima de restrição *HpyCH4III* (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*) e a reação foi incubada por 4 horas a 37°C em banho-maria. A digestão enzimática seguiu o protocolo de reação descrito na Tabela 4.

**Tabela 4:** Protocolo da digestão enzimática por *HpyCH4III* para análise do fragmento amplificado do gene da Proteína C-reativa pelo método RFLP.

SOLUÇÃO	VOLUME (µL)
10X <i>REact Buffer</i> (diluído 1:10)*	10,0
<i>HpyCH4III</i> (5 U/µL)*	0,3 (1,5 U)
Produto de reação em cadeia da polimerase	10,0
Volume final	20,3

\* *New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*.

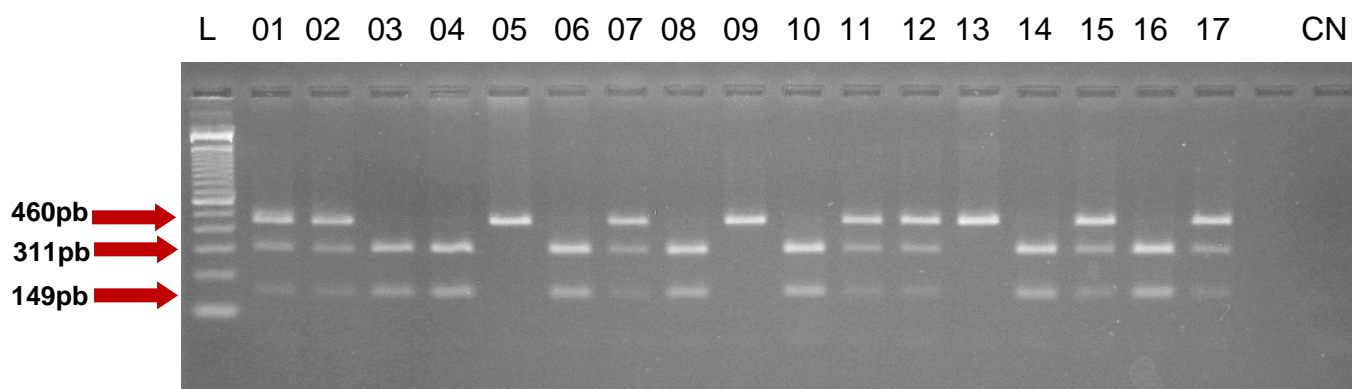
Os produtos da digestão enzimática foram analisados segundo os protocolos já descritos nos itens 3.11.3 e 3.11.5. A análise das bandas eletroforéticas permitiu a caracterização dos três possíveis genótipos do polimorfismo rs1130864.

Esse polimorfismo apresenta em sua sequência um único sítio polimórfico de restrição para a enzima, que somente será clivado quando não houver a troca da base C pela T. Com isso, o alelo C sempre será clivado devido à presença do sítio polimórfico, formando dois fragmentos de tamanhos diferentes. O alelo T não sofre a ação da enzima, pois não apresenta o sítio para clivagem (ocorre a perda do sítio polimórfico), com a formação de um único fragmento. Portanto, os três genótipos possíveis foram identificados da seguinte maneira:

- CC representa o genótipo na ausência de mutação e apresenta duas bandas eletroforéticas, com 149pb e 311pb (provenientes da clivagem do sítio polimórfico).
- CT representa o genótipo com mutação em heterozigose, contendo três bandas eletroforéticas, com 149pb e 311pb (provenientes da clivagem do sítio polimórfico presente no alelo C) e 460pb (proveniente do alelo T que não sofre a ação da enzima).

- TT representa o genótipo com mutação em homozigose, apresentando somente uma banda eletroforética com 460pb (que não sofre a ação da enzima).

A Figura 8 apresenta os resultados obtidos pela eletroforese em gel de agarose 3% após coloração com brometo de etídeo. A análise eletroforética dos produtos de digestão enzimática possibilitou a caracterização dos genótipos encontrados na população em estudo.



**Figura 8:** Análise dos produtos da digestão enzimática em 17 amostras de pacientes. Eletroforese em gel de agarose 3% após coloração com brometo de etídeo caracterizando os três perfis genéticos após a digestão com a enzima de restrição *HpyCH4III*. L: *ladder* de DNA com 100pb; amostras 01, 02, 07, 11, 12, 15 e 17: genótipo CT com mutação em heterozigose (presença de três bandas com 149, 311 e 460pb); amostras 03, 04, 06, 08, 10, 14 e 16: genótipo CC na ausência de mutação (presença de duas bandas com 149 e 311pb); amostras 05, 09 e 13: genótipo homozigoto TT com mutação em homozigose (presença de uma única banda com 460pb); CN: Controle Negativo.

### 3.12 Dosagem dos Níveis Séricos de Proteína C-reativa, Citocinas, Marcadores Inflamatórios e Autoanticorpos

Os níveis séricos de PCR foram avaliados em soro pelo método automatizado de nefelometria (*Nefelômetro Behring II, Dade Behring, Marburg, Germany*), com sensibilidade analítica de 0,175 mg/L e linearidade de até 204 mg/L, disponíveis no Setor de Imunologia Clínica do LAC/HU. Os resultados foram expressos em mg/L.

Os níveis circulantes de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  foram avaliados em plasma pelo método enzimaímunoensaio (ELISA) quantitativo, com a utilização de reagentes disponíveis comercialmente (*Kit Human IL-6 eBioscience™, San Diego, CA, USA; Kit Human IL-10 eBioscience™, San Diego, CA, USA; Kit Human TNF- $\alpha$  eBioscience™, San Diego, CA,*

USA, respectivamente). Os testes de ELISA utilizaram microplacas de poliestireno sensibilizadas com anticorpo de captura para cada citocina estudada e foram realizados utilizando-se de procedimentos técnicos padronizados, seguindo os valores de referência e as recomendações do fabricante dos reagentes empregados. Os resultados obtidos nas amostras foram calculados de acordo com cada curva de calibração construída com padrões de concentrações conhecidas para cada citocina. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Os níveis séricos das frações C3 e C4 do complemento foram determinados em soro usando o método automatizado de nefelometria (*Nefelômetro Behring II, Dade Behring, Marburg, Germany*) e expressos em mg/dL. A contagem de leucócitos sanguíneos periféricos foi realizada em sangue total usando um método automatizado e foi expressa como cells/mm<sup>3</sup>.

Os níveis circulantes de FAN foram quantificados em soro usando o método de IFI, o qual contém como substrato as células HEp2 (*IFA-ANA-HEp2-IgG, VIRO-IMMUN Labor Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany*) e foram considerados significativos quando os títulos eram  $\geq 1:160$ . Os níveis circulantes de anticorpos anti-dsDNA foram quantificados em plasma pelo método de ELISA quantitativo, com a utilização de reagentes disponíveis comercialmente (*ELISA, anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany*) e considerados significativos quando os títulos eram  $\geq 20$  UI/mL. Os níveis circulantes de anticorpos anti-nucleossomo também foram avaliados em plasma usando o método de ELISA (*anti-nucleosome, Orgentec Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany*) e valores  $\geq 20$  U/mL foram considerados positivos.

### 3.13 Análise Estatística

Todas as informações obtidas na pesquisa relativas aos dados demográficos (idade, sexo, etnia, IMC), clínicos (idade de início da doença, duração da doença, SLEDAI, terapias), imunológicos (níveis circulantes de PCR, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , C3, C4, FAN, anticorpos anti-dsDNA, anti-nucleossomo, leucócitos) e genéticos (genótipos e frequências alélicas dos polimorfismos rs1800947 e rs1130864 no gene *PCR*) dos indivíduos incluídos no estudo foram digitadas e mantidas em um banco de dados no Programa *Microsoft Office Excel 2007 (One Microsoft Way, Redmond, WA, USA)*.

As análises estatísticas foram realizadas usando os programas *Graphpad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*) e *SPSS* versão 20.0 (*SPSS, Chicago, IL, USA*). As variáveis qualitativas ou categóricas foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado, ou Exato de Fisher quando apropriado, e demonstradas em valor absoluto (n) e relativo (%). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para avaliar a normalidade de

distribuição das variáveis. Transformações logarítmicas (Ln) de dados contínuos foram utilizadas nas análises quando as variáveis não apresentaram distribuição normal. Na análise do polimorfismo rs1130864 para comparação entre o grupo de controles vs. LES, as variáveis que sofreram Ln foram idade, IMC, PCR e IL-6. Na análise do polimorfismo rs1800947 para essa mesma comparação, as variáveis que sofreram Ln foram IMC, PCR, C3, C4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . As variáveis quantitativas ou contínuas foram analisadas pelo teste *t* de Student e demonstradas como média e erro padrão da média ( $\pm$ SEM). O *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança a 95% (IC95%) também foram determinados para uma estimativa da razão de chances no estudo de associação caso-controle.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado em ambos os grupos usando o teste do Qui-Quadrado para avaliar a distribuição alélica e genotípica referente aos polimorfismos estudados. A distribuição dos genótipos na análise entre casos e controles foi avaliada pelo modelo genético co-dominante para o polimorfismo rs1130864 (CC vs. CT; CC vs. TT) e pelo modelo genético dominante para o polimorfismo rs1800947 (GG vs. GC+CC). A análise da distribuição dos genótipos dentro do grupo de pacientes nos dois polimorfismos estudados foi avaliada pelo modelo genético dominante devido à baixa frequência dos genótipos contendo os alelos raros. Os pacientes e controles foram controlados por idade, sexo e etnia. Foram realizadas também análises de regressão logística binária entre LES e controles com variáveis explanatórias para verificar quais variáveis foram independentemente associadas com a doença. Para todas as análises realizadas, foi considerado como estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ .

### 3.14 Pesquisa Bibliográfica

A pesquisa baseada na literatura foi realizada durante todo o desenvolvimento do presente estudo. As informações foram selecionadas e obtidas a partir de livros e periódicos especializados sobre o tema proposto, que pertencem ao acervo da Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina (CCS/UEL). Além disso, foram consultadas as seguintes bases de dados virtuais:

- a) Levantamento bibliográfico realizado nas bases *Medline* e PubMed disponíveis *on line* e que apresentam as referências bibliográficas, os resumos e o texto completo de artigos de periódicos na língua inglesa;
- b) Portal CAPES, com acesso a periódicos da área da saúde, medicina e doenças autoimunes.

Como estratégia de busca nas referidas bases de dados, foram utilizadas as seguintes palavras-chaves (em português ou inglês) ou Descritores de Saúde em

associação: polimorfismo genético (*genetic polymorphism*), lúpus eritematoso sistêmico (*systemic lupus erythematosus*), proteína c-reativa (*C-reactive protein*) e autoimunidade (autoimmunity).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram descritos e discutidos nos Artigos 1 e 2.

### 4.1 Artigo 1

Genetic polymorphism rs1130864 in the *C-reactive protein* is associated with systemic lupus erythematosus susceptibility and C-reactive protein serum levels.

### 4.2 Artigo 2

Influence of rs1800947 *C-reactive protein* polymorphism on systemic lupus erythematosus susceptibility, disease activity, and C-reactive protein concentrations.

## ARTIGO 1

**GENETIC POLYMORPHISM rs1130864 IN THE *C-REACTIVE PROTEIN* IS  
ASSOCIATED WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS SUSCEPTIBILITY  
AND C-REACTIVE PROTEIN SERUM LEVELS**

**Francieli Delongui<sup>1</sup>, Marcell Allyson Batisti Lozovoy<sup>2</sup>, Tatiana Mayiumi Veiga Iriyoda<sup>3,4</sup>, Neide Tomimura Costa<sup>1,3</sup>, Nicole Perugini Stadflober<sup>4</sup>, Daniela Frizon Alfieri<sup>1</sup>, Tamires Flauzino<sup>1</sup>, Isaias Dichi<sup>5</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>2</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>2</sup>**

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

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

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

<sup>4</sup>Experimental Pathological Postgraduate Program, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

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

**Acknowledgments**

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

### **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **ABSTRACT**

**Objective:** The objective of this study was to evaluate the association between the rs1130864 *C-reactive protein (CRP)* genetic polymorphism with the susceptibility for systemic lupus erythematosus (SLE), activity disease, as well as CRP serum levels in SLE Brazilian patients.

**Methods:** The study enrolled 176 SLE patients and 137 healthy controls. Clinical and laboratorial characteristics were evaluated and SLE disease activity was assessed (SLEDAI) that classified them with active disease (SLEDAI  $\geq$  6) and inactive disease (SLEDAI  $<$  6). The rs1130864 *CRP* polymorphism was determined using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.

**Results:** The binary logistic regression showed that SLE patients presented higher body mass index ( $p=0.046$ ) and CRP ( $p=0.017$ ) serum levels compared to controls. The genotype and allelic frequency of rs1130864 polymorphism of SLE patients differed from controls [CC vs. CT= odds ratio (OR): 1.730, 95% confidence interval (CI): 1.068-2.803,  $p=0.035$ ; CC vs. TT= OR: 3.667, 95% CI: 1.410-9.533,  $p=0.009$ ; C vs. T= OR: 1.883, 95% CI: 1.299-2.728,  $p=0.001$ ]. The binary logistic regression showed that SLE patients carrying the T allele presented higher serum levels of CRP ( $p=0.009$ ), were more frequent Caucasians ( $p=0.018$ ), and with no use of immunosuppressor ( $p=0.004$ ) compared with the patients carrying the C allele. However, the SLEDAI and anti-dsDNA frequency did not differ from those carrying T vs. C allele ( $p=0.595$  and  $p=0.243$ , respectively).

**Conclusion:** Our data showed that rs1130864 *CRP* polymorphism was associated with SLE susceptibility and the CRP serum levels, but not with the disease activity, suggesting that this polymorphism may play a role in the pathophysiology of SLE through increasing the CRP levels and, probably, this protein plays an inflammatory role in SLE pathophysiology.

**KEYWORDS:** Systemic lupus erythematosus; genetic polymorphism; C-reactive protein.

### **INTRODUCTION**

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that involves immune dysregulation at the interface between the innate and adaptive immune systems (Herrmann et al, 1998; Rahman and Isenberg, 2008). The pathogenesis of SLE remains incompletely understood; it is complex and multifactorial, involving interactions between multiple genes, hormones, and several environmental factors (Deapen et al, 1992; Shih et al, 2008). Both

endogenous and exogenous triggers contribute to evolution of disease and induction of disease flares, such as viral infections, ultraviolet (UV) light exposure, and certain drugs. Basic research has led to the widely held view that defective clearance of apoptotic cellular debris in SLE patients causes a loss of self-tolerance, autoantibody generation, and the formation of immune complexes (Herrmann et al, 1998; Rahman and Isenberg, 2008). The autoantibodies are directed against a number of constituents of the cell nucleus, including double-stranded DNA (dsDNA), chromatin, and small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) (Pisetsky, 2000), as well as cytoplasmic and circulating proteins (Petri, 2006). The chronic inflammation is thought to play a pivotal role in the pathogenesis of SLE once several clinical manifestations of the disease are thought to be the result of autoantibody and immune-complex deposition in tissues leading to a secondary inflammatory response (Shih et al, 2008).

A significant amount of data support a role for host genetics as both predisposing factors as important determinants of patient outcomes (Block et al, 1975; Alarcón-Riquelme, 2006). Genetic association studies have been considered various genes encoding proteins with regulatory or adaptive functions in the immune system as candidates for SLE susceptibility (Nath et al, 2004; Croker et al, 2005). When these data sets are compared, a region on the long arm of chromosome 1, 1q23-24, is linked with SLE in different populations (Moser et al, 1998; Shai et al, 1999). The gene coding for C-reactive protein (CRP) is located at 1q23.2, and the unique position of the *CRP* makes it logical position candidate gene to investigate as a susceptibility locus for SLE (Shih et al, 2008).

*CRP* is also a functional candidate gene based on the physiological activity of its products (Russell et al, 2004; Shih et al, 2008). It is produced in response to several tissue damage, such as inflammation, infection, and trauma (Eklund et al, 2005), and blood levels of this protein are generally higher in females than in males (DeLongui et al, 2013). One of the functions of CRP is its ability to bind chromatin (Robey et al, 1984), histones (Du Clos et al, 1988), and apoptotic cells (Gershov et al, 2000), promoting the removal of death cells with potential immunogenicity, and recruiting proteins of the complement system and Fc-receptors mediated effectors pathways (Szalai, 2004). These functions have been associated to the prevention of potential nuclear antigen-specific autoimmune responses (Gershov et al, 2000). Moreover, autoimmunity prevention through CRP opsonization may come from its ability to prevent activation of autoreactive B cells by promotion clearance of autoantigens to non-antigens presenting sites (Szalai, 2004).

Some studies have suggested that SLE is characterized by lower CRP levels than would be predicted (Pepys et al, 1982; Rordorf et al, 1982). Characteristically, in human SLE there is relative failure of the acute phase CRP response during active disease despite evident tissue inflammation (Pepys et al, 1982), and little or no increase of CRP levels with flare-up of the disease have been reported. When elevated CRP levels are detected, they are indicative of an intercurrent infection rather than of lupus activity (Linares et al, 1986; Rhodes et al, 2008). However, the value of using CRP to monitor SLE disease activity has remained controversial given the inconsistent correlation between circulating CRP and disease activity (Linares et al, 1986; Barnes et al, 2005). The abnormal elevation pattern of CRP in patients with SLE provided the first clinical clue that variation in the CRP may contribute to the pathogenesis of SLE (Shih et al, 2008). Some authors (Russell et al, 2004) hypothesized that defective disposal of potentially immunogenic material, indicated by low basal CRP levels, can be a contributory factor in SLE pathogenesis.

Moreover, the factors affecting the baseline level of CRP concentration are incompletely understood (Yan et al, 2007). Heritability estimates suggest that as much as 60.0% of the variance in baseline CRP levels is attributable to genetic variation (Carlson et al, 2005; Crawford et al, 2006). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are a very common variant at *CRP* gene, and each of them seems to affect the CRP serum levels at different ways (Rhodes et al, 2010).

The rs1130864 SNP is located in the 3'-untranslated region (UTR) of the *CRP* gene and several studies have been shown that the T variant allele is associated with higher serum levels of CRP in inflammatory conditions, such as cardiovascular heart disease (Brull et al, 2003) and periodontitis (D'Aiuto et al, 2005), than the C allele. The role of this polymorphism on the CRP serum levels and its association with susceptibility for SLE are still unclarified (Russell et al, 2004; Kim et al, 2009). We hypothesized that this polymorphism, which seems to be associated with high serum levels of CRP, could exert a protective role for SLE susceptibility and disease activity. In order to address this question, the aim of the present study was to evaluate the association between the rs1130864 polymorphism with the susceptibility for SLE and disease activity, as well as with serum levels of CRP and other inflammatory markers in SLE Southern Brazilian patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

A total of 176 unrelated SLE patients, diagnosed according to the American College of Rheumatology criteria for SLE (Hochberg, 1997; Petri et al, 2012), were consecutively recruited, during 2009 to 2015, from the Specialized Outpatient Department of University Hospital, State University of Londrina, Paraná State, Southern Brazil. As control group, 137 unrelated healthy individuals were recruited from the Blood Bank of Londrina during the same period, sex, age, and ethnicity controlled. None of the subjects enrolled in the study was judged to have concomitant clinical symptoms of apparent inflammatory, autoimmune or infectious diseases at the time of sample collection.

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

### **Demographic, clinical, and laboratory characteristics**

Demographic and clinical data were obtained using a standard questionnaire and medical records. Anthropometric measurements, such as body weight (measured to the nearest 0.1 kg using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes), and height (measured to the nearest 0.1 cm using a stadiometer) were evaluated. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Ethnicity was classified according to individual's self-perception in Caucasian and non-Caucasian (Brazil, 2010). Disease activity was assessed using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI). The patients were categorized as inactive SLE when SLEDAI < 6 and active SLE when SLEDAI  $\geq$  6 (Bombardier et al, 1992).

Peripheral blood samples were collected with EDTA as anticoagulant and without anticoagulant after 12 hours fasting. All samples were immediately centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes and buffy-coat aliquots were stored at -20°C, while plasma and serum aliquots were stored at -80°C for posterior analyzes. The samples were identified, consecutively, by number to guarantee the confidentiality. The serum levels of CRP, with detection limit of <0.175 mg/L, and complement components C3 and C4, were determined using a nephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany), and were expressed as mg/L and mg/dL, respectively. The interleukin (IL)-6 serum levels were measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA). Antinuclear antibodies (ANA) were quantified using indirect immunofluorescence assay (IFA) with HEp2 cells as substrate (IFA-ANA-HEp2-IgG, VIRO-IMMUN Labor Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and were considered significant

when titers  $\geq 1:160$ ; anti-dsDNA antibodies were quantified using enzyme-linked immunoassay (ELISA, anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and were considered significant when titers  $\geq 20$  IU/mL. Peripheral white blood cell counts were also quantified using an automatic method and expressed as cells/mm<sup>3</sup>.

### **rs1130864 *CRP* genetic polymorphism**

Genomic DNA was extracted from a buffy coat of peripheral blood cells using a resin column procedure (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brazil). One hundred ng of DNA was used to amplify a 460 base pair (bp) fragment of the *CRP* by polymerase chain reaction (PCR) as previously reported (Yan et al, 2007) with some modifications. Briefly, the primers used were determined according to the GenBank n° M11880.1 (Yan et al, 2007) as follows: primer forward (*CRP* +1444 sense) 5' CCC TTC AGT CCT AAT GTC C 3'; primer reverse (*CRP* +1444 antisense) 5' GCT CTT GCC TTA TGA GTT TT 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). PCR was performed with a final volume of 25  $\mu$ L, with 0.15 mM of each primer, 1.50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.10 mM dNTP, 1.25 units thermostable DNA polymerase (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 100 ng of the DNA sample. PCR conditions were performed in a thermocycler (Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA), and comprised of 5 min denaturation at 95°C for initial denaturation; 37 cycles of 45 sec at 95°C for denaturation, 45 sec at 56°C for the annealing and 45 sec at 72°C for the elongation; and 10 min at 72°C for final elongation. In all PCR analyses, a negative control (without a DNA sample) was included.

The PCR products were subjected to restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis as described previously (Yan et al, 2007) with some modifications. Briefly, 10  $\mu$ L of the PCR products were completely digested with 1.5 units of *Hpy*CH4III (5 U/ $\mu$ L) enzyme (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) for 4 h at 37°C. Further, 10  $\mu$ L of the digested samples were analyzed by electrophoresis on a 3% agarosis gel (70V, 1 h) and stained with ethidium bromide during 30 min. The electrophoresis profile was captured and recorded by the photo documentation system L-PIX-HE (Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil). The C allele includes a restriction site for *Hpy*CH4III, which resulted in 311bp and 149bp fragments, and the T allele does not include the restriction site for *Hpy*CH4III, resulting in a fragment of 460bp. The heterozygous genotype results in three fragments (460, 311 and 149bp).

## Statistical analysis

Categorical variables were analyzed using a Chi-square test, or Fisher Exact test when appropriate, and were expressed as absolute (n) and relative (%) numbers. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Natural logarithmic of continuous data (age, BMI, CRP, and IL-6) was used in the analyses when the variables were not normally distributed. Continuous variables were analyzed using Student's *t* test, and were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean ( $\pm$ SEM). The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also determined to evaluate case-control study association. Allelic and genotypic frequencies were tested in Hardy-Weinberg equilibrium using the Chi-square test. The association between cases and controls was evaluated using co-dominant genetic model (CC vs CT; and CC vs TT). The association between demographic, laboratory, and clinical variables obtained in patients was evaluated using the dominant genetic model (CC vs. CT+TT). Binary logistic regression analysis was made to evaluate whether the variables that presented  $p < 0.10$  were independently associated with SLE. The results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . The statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) Programs.

## RESULTS

The demographic, clinical and laboratory characteristics of the 176 SLE patients and 137 controls are presented in Table 1 and Figure 1. As would be expected, patients and controls did not differ on age, sex, and ethnicity. SLE patients presented higher BMI [mean 26.80 kg/m<sup>2</sup> ( $\pm 0.60$ ) vs. mean 25.50 kg/m<sup>2</sup> ( $\pm 0.40$ ),  $p = 0.046$ ], higher serum levels of CRP [mean 5.22 mg/L ( $\pm 0.53$ ), vs. mean 2.80 mg/L ( $\pm 0.31$ ),  $p = 0.002$ ], and IL-6 [mean 7.05 pg/mL ( $\pm 0.97$ ) vs. mean 5.65 pg/mL ( $\pm 1.66$ ),  $p < 0.0001$ ] when compared to controls. Most of the SLE patients (73.90%) presented inactive disease (SLEDAI  $< 6$ ), seropositivity for ANA (71.60%) with the nuclear speckled pattern of fluorescence (36.90%), for anti-dsDNA (53.40%) autoantibodies, were treated with corticosteroids (96.00%) and antimalarial drugs (75.60%). After binary logistic regression analysis with the variables that presented  $p < 0.10$ , only BMI and CRP serum levels were independently associated with SLE disease (Table 2).

The distribution of rs1130864 *CRP* genotypes and alleles were in Hardy-Weinberg equilibrium in both subgroups ( $p > 0.05$ ), and are presented in Table 3. Among the SLE patients, 84 (47.70%) were CC, 71 (40.40%) were CT and 21 (11.90%) were TT. In the control group, 88 (64.20%) were CC, 43 (31.40%) were CT and 6 (4.40%) were TT. There

was significant difference between the frequencies of CC vs. CT genotypes (OR 1.730, 95% CI: 1.068 – 2.803,  $p=0.035$ ) and between CC vs. TT genotypes (OR 3.667, 95% CI: 1.410 – 9.533  $p=0.009$ ). Moreover, the frequency of the T allele in SLE patients were higher compared to controls (C vs. T, OR 1.883, 95% CI: 1.299 - 2.728,  $p=0.001$ ).

The clinical and laboratory characteristics of the SLE patients according to rs1130864 *CRP* polymorphism were analyzed considering the dominant model, as CC vs CT+TT. The SLE patients carrying the CT+TT genotypes presented higher serum levels of CRP [mean 6.39 mg/L ( $\pm 0.88$ ), vs. mean 3.87 mg/L ( $\pm 4.87$ ),  $p=0.014$ ], and IL-6 [mean 9.67 pg/mL ( $\pm 1.09$ ) vs. mean 6.88 pg/mL ( $\pm 0.76$ ),  $p=0.039$ ], as well as higher frequency of unmedicated with immunosuppressor ( $p=0.019$ ) compared with patients carrying the CC genotype. Anti-dsDNA showed a trend toward higher frequency among those with the CT+TT genotypes ( $p=0.075$ ). However, the SLEDAI frequency did not differ from those carrying T vs. C allele ( $p=0.595$ ) (Table 4 and Figure 1). After binary logistic regression analysis between the explanatory variables with  $p<0.10$  in the table 4 and the rs1130864 polymorphism using CC genotype as reference, only CRP serum levels, ethnicity, and no use of immunosuppressor were independently associated with CT+TT genotypes in SLE patients ( $p=0.009$ ,  $p=0.018$ , and  $p=0.004$ , respectively).

## DISCUSSION

The main finding of the present study was the association between the CT and TT genotypes, as well as the T allele of rs1130864 *CRP* polymorphism with the susceptibility for SLE in patients from Southern Brazilian population; moreover, the presence of T allele (in heterozygous and homozygous genotypes) was independently associated with higher CRP serum levels than the presence of C allele in SLE patients. The association between the genotypes carrying the T allele with higher serum levels of this inflammatory marker suggests that this variant allele may exert an effect on SLE clinical course. However, this polymorphism was not associated with anti-dsDNA frequency and SLEDAI values, indicating no association with disease activity. Other important result was that BMI and serum levels of CRP were independently associated with SLE disease. Moreover, ethnicity and immunosuppressor use were independently associated with patients carrying the T allele comparing with those carrying the C allele. We will now discuss these findings on a point by point basis.

To our knowledge, this was the first study to investigate the association between rs1130864 polymorphisms with SLE susceptibility and disease activity in Brazil. The overall distribution of rs1130864 genotypes and allele frequency obtained in this cohort is in agreement with previous study (Brull et al, 2003), but discordant with others (Grammer et al, 2009; Kim et al, 2009). All studies related were carried out in more genetically homogeneous populations, and the discrepancy in results could be explain based on differences of our subjects, since Brazil has one of the most genetically heterogeneous populations in the world (Pena et al, 2011).

The association between T variant allele and SLE showed that subjects carrying at least one T allele were 1.883 more likely to present SLE than those carrying the C allele, while subjects carrying the TT and the CT genotypes were 3.667 and 1.730, respectively, more likely to present the disease compared with subjects carrying the CC genotype. In our study, ethnicity was independently associated with patients carrying the T allele comparing with those carrying the C allele. Ours results are in agreement with Russell et al, (2004), who showed that ethnicity influenced the allelic frequency in some SNPs, including the rs1130864 *CRP* polymorphism. In their study, the frequency of the minor T allele of this polymorphism was significantly higher when they compare European-Caucasian (31.0%) to Afro-Caribbean (16.0%) population.

The role of the rs1130864 polymorphism, by itself, has not been investigated on SLE susceptibility. Moreover, the role of polymorphisms affecting the CRP serum levels in SLE patients remained contradictory. While one study suggested that low levels of CRP that were associated with rs1800947 and rs1205 *CRP* polymorphisms could be a risk effect for disease susceptibility (Russell et al, 2004), other did not confirm this effect when the rs1800947 and rs1130864 *CRP* polymorphisms were evaluated (Kim et al, 2009). In our study, we found that SLE patients carrying the minor T allele, both in homozygosity and heterozygosity, showed higher serum levels of CRP than patients carrying the C allele in homozygosity. This result may suggest that this genetic variant influence the CRP serum levels, probably because its location in the disproportionately long length 3'-UTR of the *CRP*, indicating a regulatory role, which could affect the stability of the mRNA and, therefore, increased the CRP production (Danik and Ridker, 2007; Yan et al, 2007).

The higher CRP levels observed among the SLE patients with the T allele than those with the C allele is in agreement with previous studies (Brull et al, 2003; D'Aiuto et al, 2005; Morita et al, 2006; Yan et al, 2007; Grammer et al, 2009). The rs1130864 *CRP* polymorphism was strongly and consistently associated with basal CRP levels in patients with different

inflammatory conditions, such as cardiovascular heart disease (Brull et al, 2003; Yan et al, 2007; Grammer et al, 2009), periodontitis (D'Aiuto et al, 2005) and healthy subjects (Morita et al, 2006). This SNP, by itself, is accounted for 3.7% of the total variance in baseline blood CRP (Yan et al, 2007).

On the other hand, our results are in disagreement with a study (Kim et al, 2009) that found no association between the T variant allele with higher CRP levels when compared Korean SLE patients and controls. However, they showed that thrombocytopenia was significantly more frequent in SLE patients carrying the minor allele T than those carrying the CC homozygous genotype. Another study (Kovacs et al, 2005) also found no association between plasma CRP concentration and two SNPs in the *CRP* (rs2794521 and rs1130864) in Sweden subjects. A group studying the rs1130864 *CRP* polymorphism and the risk of recurrent ischemic events in Spanish patients found no significant associations between the rs1130864 genotype distribution and circulating CRP levels (Arenillas et al, 2009).

In complex traits, such as SLE, multiple genes may each exert a relatively weak influence. There may be interactions between genes, complicating the ability to associate any particular genetic variant with the phenotype. Interactions between genes and environmental factors further confound the analysis of complex genetic traits, including the genetics of CRP expression (Danik and Ridker, 2007). Moreover, it is likely that specific SNPs at a candidate gene locus represent only part of the overall genetic variation that may contribute to phenotype heterogeneity (Arenillas et al, 2009).

Besides the higher CRP serum levels, the patients with the CT+TT genotypes evaluated in the present study were also more frequent among those unmedicated with immunosuppressor, a factor that could influence the CRP levels obtained; however, the association between the elevated CRP and these genotypes were independently from other variables, including the immunosuppressor use. This result underscores the association observed between CRP levels and rs1130864 polymorphism.

Although SLE patients carrying the minor T allele of the rs1130864 *CRP* polymorphism presented higher CRP levels than those with the C allele, we are unable to affirm whether the elevated CRP serum levels are protective or risk factor in these patients due to the study design. Some authors (Marnell et al, 2005) reported that, although CRP is widely used as a marker of inflammation in various rheumatologic diseases, the biological function of CRP remains uncertain, particularly because it exerts either pro- or anti-inflammatory action depending on the level and type of Fc $\gamma$  receptor expressed on cells at the site of CRP interaction.

In our study, serum levels of CRP were independently associated with SLE disease, in agreement with previous studies (Williams et al, 2005; Lee et al, 2008). These authors also observed that most SLE patients have elevated CRP levels during the evolution of the disease process, irrespective of concomitant active infection. It was demonstrated that CRP was associated with a broad range of clinical features, such as myocarditis, pulmonary hypertension, anemia, as well as with anti-dsDNA in SLE (Lee et al, 2008). These authors related that the most striking finding in their study is that CRP was independently associated with total organ damage and the prevalence of damage in at least one organ system was 63.0% in these SLE patients after a mean follow-up of 9.8 years. The association between CRP and organ damage was explained by the finding that CRP may reflect lupus activity. Moreover, these authors affirmed that these findings highlight CRP as a strong marker for increased disease activity and organ damage accrued over the course of SLE. As the same way, another study (Williams et al, 2005) reported that 70.0% of North-American SLE patients showed elevated CRP values and only 30% showed normal serum CRP levels.

However, the results are conflicting and the findings are discordant. Some studies showed an ameliorative effect of CRP on SLE (Russell et al, 2004; Jonsen et al, 2007). These authors affirmed that low serum levels of CRP are associated with an increased risk for developing SLE, because CRP failure on its ability to promoting the removal of death cells with potential immunogenicity, leading to the development of potential nuclear antigen-specific autoimmune responses (Gershov et al, 2000). Although these previous authors have pointed out that active SLE may be associated with no elevation of CRP, we cannot, in our cohort, confirm this impression. Our findings indicate that, using a sensitive method for serum CRP quantification, such as high sensitivity (hs)CRP, the levels of this protein is often moderately elevated when a relatively large group of SLE patients is studied. The apparent discrepancies between our findings and previous studies could be result of differences in the sampling and recruitment methodologies used, as well as in the methods for laboratory markers measurements and therapies for SLE patients.

In our study, BMI were independently associated with SLE disease. It is in agreement with preview study (Urowitz and Gladman, 2000), who shown that obesity is common in lupus patients and can compound lupus-specific risk, such as atherosclerotic coronary artery disease. Furthermore, those suffering from SLE commonly take immunosuppressive therapy, which has numerous adverse effects, including weight gain (Busti et al, 2005).

There is no consensus in the literature regarding the most accurate or useful marker of SLE disease activity. Individual markers, such as serum C3 and C4 levels or the anti-dsDNA

antibody titer, or comprehensive activity index, such as SLEDAI, have been used in clinical practice or clinical trials to arrive at an accurate assessment of clinically significant immune system activation (Kirou et al, 2005). Active disease in SLE is frequently accompanied by high serum levels of circulating IgG anti-dsDNA, low levels of C3 and C4, elevated erythrocyte sedimentation rate or increasing proteinuria (Williams et al, 2005). Moreover, reduced serum C3 and C4 levels have been considered to be important parameters to define SLE activity using SLEDAI (Bombardier et al, 1992). We found that SLE patients carrying the T allele in homozygous and heterozygous genotype showed a trend toward higher frequency of patients with anti-dsDNA  $\geq 20$  IU/mL compared to those carrying the CC genotype that did not remain after the binary logistic regression analysis. Moreover, SLEDAI values did not differ from those carrying T vs. C allele. These results suggest that, in our group of SLE patients, rs1130864 polymorphism is not associated to the disease activity.

The demographic and clinical characteristics of the patients of the present study are consistent with previous studies, such as sex, age and ethnicity (Williams et al, 2005; Lee et al, 2008), and the low SLEDAI (Pons-Estel et al, 2010), but are in disagreement with others (Bertoli et al, 2008; Eudy et al, 2014). The low SLEDAI presented by the most of our SLE patients is probably a result of the SLE therapy used by them at the time of inclusion in the study. Although SLE is more frequent in Asiatic and Black individuals, our cohort is composed predominantly by Caucasians. Although most of the population from Southern Brazil is composed by European descendants, it should be remembered that skin-color classification is very subjective in Brazil, because the miscegenation rates are high (Pena et al, 2011).

The findings of the present study should be interpreted in the context of its limitations. First, the ethnicity of the subjects was self-reported (Brazil, 2010). Second, the study design was based on a single basal CRP measurement and a specific SNP determination, which precludes the assessment of how other factors may impact on the complex relationship between *CRP* genotype, CRP level, as well as the susceptibility for SLE. Third, the study does not allow causal relationships to be inferred. Finally, as an acute phase reactant, CRP increases with acute infection or trauma. Although patients with clinical inflammatory and infectious conditions were excluded from this study, it is always possible that subclinical diseases or minor trauma contributed to an elevation of the CRP serum levels.

Until now, it is not clear how elevation of basal CRP level in complex disorders such as SLE is a risk factor of chronic inflammation or a contributing factor to the pathogenesis of the disease. If elevation of baseline CRP level has a role in the pathogenesis of SLE, the allele

T of the rs1130864 polymorphism related to elevation of baseline CRP could also be a contributing factor to disease pathogenesis. These data appear to be useful in understanding basal CRP expression and its relation to SLE.

In conclusion, our data showed that rs1130864 *CRP* polymorphism was associated with SLE susceptibility and with serum levels of CRP in SLE patients from Southern Brazilian. Our results may suggest that elevated CRP can be related with the rs1130864 polymorphism and, probably, that this protein plays an inflammatory role in SLE pathophysiology. This finding pointed out that a genetic background may underlie, in part, the relationship between CRP levels and the susceptibility for SLE. However, our results should be cautiously interpreted as preliminary and need to be confirmed in a large series of SLE patients using more refined genetic variation techniques aimed at identifying *CRP* gene haplotypes. Further researches should be required to ascertain the functional variant at the *CRP* locus, but our study extends the observation that genotype could modulate the response to an inflammatory stimulus. Understanding this relationship may help identify underlying genetic risk factors associated with disparities in SLE phenotypes.

**Table 1** Baseline characteristics of patients with systemic lupus erythematosus and healthy controls enrolled between 2009 and 2015 from Southern Brazilian population.

<b>Characteristics</b>	<b>Controls (n=137)</b>	<b>SLE patients (n=176)</b>	<b>p value</b>
Age (years) <sup>§</sup>	38.30 (±0.80)	40.70 (±1.00)	0.078
Sex*			
Female/male	127 (92.70) / 10 (7.30)	164 (93.20) / 12 (6.80)	0.954
Ethnicity*			
Caucasian/Non-Caucasian	95 (69.34) / 42 (30.66)	111 (63.10) / 65 (36.90)	0.365
Body Mass Index (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>§</sup>	25.50 (±0.40)	26.80 (±0.60)	0.046
Age at onset of disease (years)	NA	31.17 (±0.98)	
Disease duration (years)	NA	9.90 (±0.60)	
SLEDAI			
< 6 (inactive disease)	NA	130 (73.90)	
≥ 6 (active disease)	NA	46 (26.10)	
C-reactive protein (mg/L) <sup>§</sup>	2.80 (±0.31)	5.22 (±0.53)	0.002
Interleukin-6 (pg/mL) <sup>§</sup>	5.65 (±1.66)	7.05 (±0.97)	<0.0001
C3 (mg/dL)			
< 90 mg/dL	NA	34 (19.32)	
≥ 90 mg/dL	NA	142 (80.68)	
C4 (mg/dL)			
< 10 mg/dL	NA	18 (10.23)	
≥ 10 mg/dL	NA	158 (89.77)	
ANA			
Negative (<1:160)	NA	50 (28.40)	
Positive (≥1:160)	NA	126 (71.60)	
ANA pattern			
Nuclear speckled	NA	65 (36.90)	
Nuclear homogeneous	NA	42 (23.90)	
Other#	NA	19 (10.80)	
<b>Characteristics</b>	<b>Controls (n=137)</b>	<b>SLE patients (n=176)</b>	<b>p value</b>

Anti-dsDNA (IU/mL)		
Negative (<20 IU/mL)	NA	82 (46.60)
Positive ( $\geq$ 20 IU/mL)	NA	94 (53.40)
Therapy		
Corticosteroids (yes/no)	NA	169 (96.00) / 7 (4.00)
Anti-malarial (yes/no)	NA	133 (75.60) / 43 (24.40)
Immunosuppressors (yes/no)	NA	69 (39.20) / 107 (60.80)

---

\*Categorical data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and were analyzed using Chi-Square test. <sup>§</sup>Continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean ( $\pm$ SEM) and were analyzed using Student's *t* test; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI: Systemic Lupus Erythemathosus Disease Activity Index; C3: complement 3; C4: complement 4; ANA: antinuclear antibodies; anti-dsDNA: anti-double stranded DNA antibodies. #Other: Nuclear Centromere, Nucleolar, and Citoplasmic immunofluorescence patterns. NA: not applicated.

**Table 2** Results of the binary logistic regression analysis between systemic lupus erythematosus patients and controls (reference) and explanatory variables.

<b>Parameters</b>	<b>B</b>	<b>Wald</b>	<b>df</b>	<b>p</b>	<b>Odds Ratio (95% CI)</b>
CRP (mg/L)	0.068	5.683	1	0.017	1.071 (1.012 - 1.133)
IL-6 (pg/mL)	0.006	0.401	1	0.526	1.006 (0.987 - 1.026)
Age (years)	0.009	0.688	1	0.407	1.009 (0.988 - 1.031)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.052	3.969	1	0.046	1.053 (1.001 - 1.108)

CI: confidence interval; CRP: C-reactive protein; IL-6: interleukin-6; BMI: body mass index.

**Table 3** Frequency of rs1130864 polymorphism obtained from patients with systemic lupus erythematosus and healthy controls from Southern Brazilian population.

<b>Overall rs1130864 polymorphism</b>				
	<b>Controls (n=137)</b>	<b>SLE patients (n=176)</b>	<b>p value</b>	<b>Odds Ratio (95% CI)</b>
CC	88 (64.20)	84 (47.70)		Reference
CT	43 (31.40)	71 (40.40)	0.035	1.730 (1.068 - 2.803)
TT	6 (4.40)	21 (11.90)	0.009	3.667 (1.410 - 9.533)
C allele	219 (79.90)	239 (67.90)	0.001	1.883 (1.299-2.728)
T allele	55 (20.10)	113 (32.10)		

Categorical data were expressed as absolute number (n) and percentage (%); the distribution of genotypes and allelic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls (chi-square test,  $p > 0.05$ ). CRP: C-reactive protein; SLE: systemic lupus erythematosus; CI: confidence interval; CC: homozygous genotype for the C allele; CT: heterozygous heterozygous; TT: homozygous genotype for the T allele; C: allele with the restriction site of the *Hpy*CH4III enzyme; T: allele without the restriction site of the *Hpy*CH4III enzyme.

**Table 4** Baseline characteristics of systemic lupus erythematosus patients enrolled between 2009 and 2015 from Southern Brazilian population, according the rs1130864 polymorphism.

Characteristics	SLE patients (n=176)		p value
	CC (n=84)	CT+TT (n=92)	
Age (years) <sup>§</sup>	40.70 (±1.30)	41.10 (±1.50)	0.831
Sex (female/male)*	80 (95.20) / 4 (4.80)	84 (91.30) / 8 (8.70)	0.463
Ethnicity*			
Caucasian/Non-Caucasian	47 (56.00) / 37 (44.00)	64 (69.60) / 28 (30.40)	0.087
Body Mass Index (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>§</sup>	27.40 (±0.70)	27.80 (±0.60)	0.923
Age at onset of disease (years) <sup>§</sup>	31.40 (±1.50)	31.10 (±1.30)	0.785
Disease duration (years) <sup>§</sup>	9.56 (±0.87)	10.26 (±0.74)	0.539
SLEDAI <sup>§*</sup>	3.70 (±0.40)	3.90 (±0.40)	0.725
<6 (inactive disease)	60 (71.40)	70 (76.10)	0.595
≥6 (active disease)	24 (28.60)	22 (23.90)	
C-reactive protein (mg/L) <sup>§</sup>	3.87 (±4.87)	6.39 (±0.88)	0.014
Interleukin-6 (pg/mL) <sup>§</sup>	6.88 (±0.76)	9.67 (±1.09)	0.039
C3 (mg/dL)*			
< 90mg/dL	14 (16.70)	20 (21.70)	0.509
≥ 90mg/dL	70 (83.30)	72 (78.30)	
C4 (mg/dL)*			
< 10mg/dL	07 (8.30)	11 (12.00)	0.586
≥ 10mg/dL	77 (91.70)	81 (88.00)	
ANA*			
<1:160	27 (32.10)	23 (25.00)	0.378
≥1:160	57 (67.90)	69 (75.00)	
ANA pattern*			
Nuclear speckled	29 (34.50)	38 (41.30)	0.970
Nuclear homogeneous	19 (22.60)	23 (25.00)	
Other#	06 (7.10)	07 (7.60)	

SLE patients (n=176)

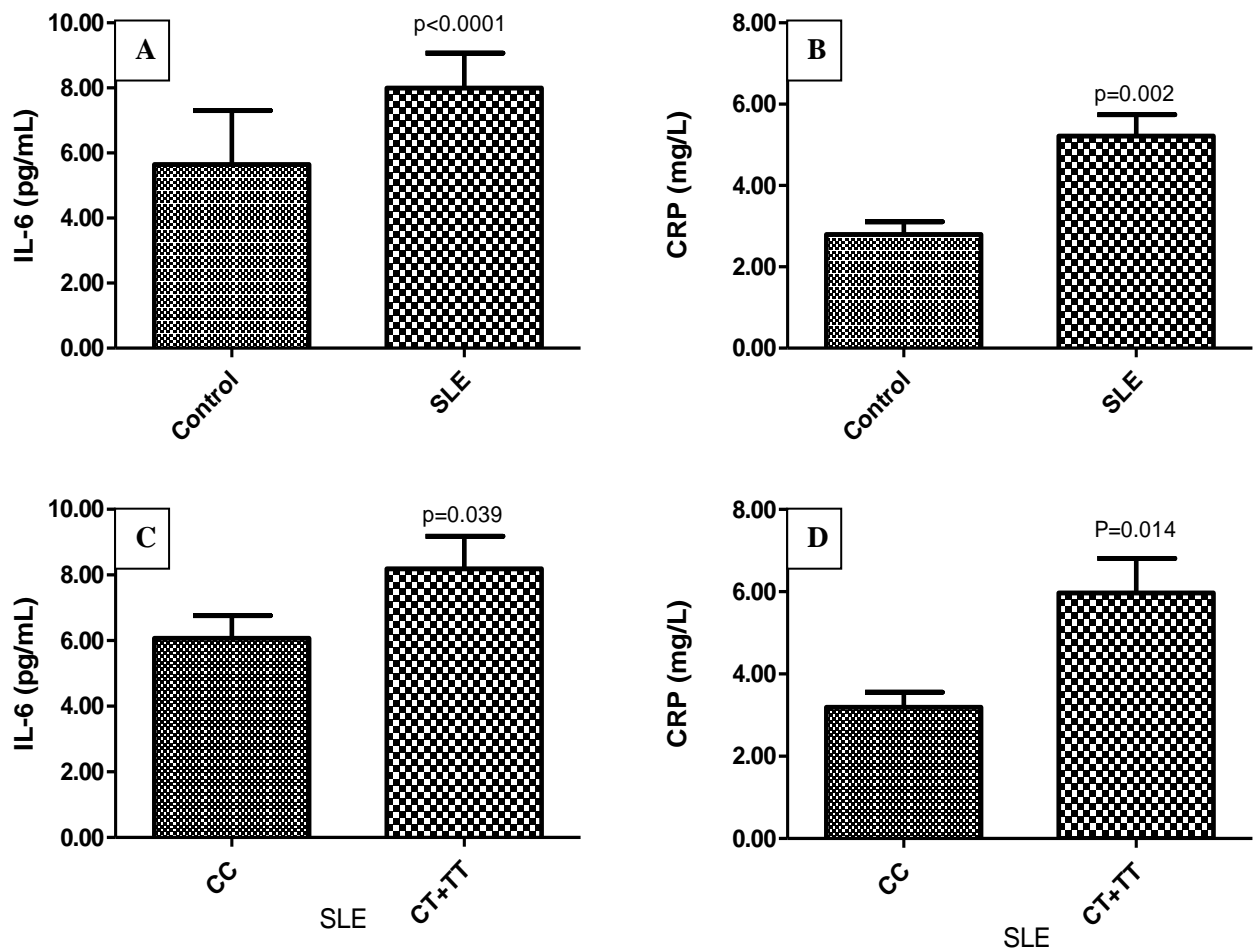
Characteristics	CC (n=84)	CT+TT (n=92)	p value
Anti-dsDNA (IU/mL)*			
< 20 IU/mL	46 (54.80)	37 (40.20)	0.075
≥ 20 IU/mL	38 (45.20)	55 (59.80)	
Leukocyte (x10 <sup>3</sup> cell/μL)*			
<3.00 (x10 <sup>3</sup> cell/μL)	03 (3.60)	03 (3.30)	1.000
≥3.00 (x10 <sup>3</sup> cell/μL)	81 (96.40)	89 (96.70)	
Therapy			
Corticosteroids (mg/day) <sup>§</sup>	12.25 (±1.26)	12.30 (±1.28)	0.977
Corticosteroids (yes/no)*	81 (96.40) / 3 (3.60)	87 (94.60) / 5 (5.40)	0.722
Anti malarial (yes/no)*	62 (73.80) / 22 (26.20)	70 (76.10) / 22 (23.90)	0.862
Immunosuppressors (yes/no)*	41 (48.80) / 43 (51.20)	28 (30.40) / 64 (69.60)	0.019

\*Categorical data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and were analyzed using Chi-Square, or Fisher Exact test when appropriate. <sup>§</sup>Continuous data were expressed as mean ± standard error of mean (±SEM) and were analyzed using Student's *t* test; SLE: systemic lupus erythematosus; CC: homozygous genotype for the C allele; CT: heterozygous genotype; TT: homozygous genotype for the T allele; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; C3: complement 3; C4: complement 4; ANA: antinuclear antibodies; anti-dsDNA: anti-double stranded DNA antibodies; # Other: Nuclear Centromere, Nucleolar, and Cytoplasmic immunofluorescence patterns.

**Table 5** Results of binary logistic regression analysis between systemic lupus erythematosus patients with CT+TT genotypes versus CC genotype (reference) and explanatory variables.

<b>Parameters</b>	<b>B</b>	<b>Wald</b>	<b>df</b>	<b>p value</b>	<b>Odds Ratio (95% CI)</b>
CRP (mg/L)	0.114	6.891	1	0.009	1.120 (1.029 – 1.220)
IL-6 (pg/mL)	0.002	0.021	1	0.884	1.002 (0.972 – 1.033)
Anti-dsDNA (IU/mL)	- 0.431	1.365	1	0.243	0.650 (0.315 – 1.339)
Ethnicity	0.938	5.566	1	0.018	2.555 (1.772 – 5.570)
Immunosuppressor	1.091	8.245	1	0.004	2.977 (1.414 – 6.269)

CI: confidence interval; CRP: C-reactive protein; IL-6: interleukin-6; anti-dsDNA: anti-double stranded DNA antibodies.



**Figure 1** Serum levels of interleukin (IL)-6 and C-reactive protein (CRP) between controls and systemic lupus erythematosus patients (A and B) and according to their rs1130864 *CRP* polymorphism (C and D). Continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean ( $\pm$ SEM) and were analyzed using Student's *t* test. SLE: systemic lupus erythematosus; CC: homozygous genotype for the C allele; CT: heterozygous genotype; TT: homozygous genotype for the T allele.

## REFERENCES

Alarcón-Riquelme ME. The genetics of systemic lupus erythematosus: understanding how SNPs confer disease susceptibility. *Semin Immunopathol* 2006; 28: 109–117.

Arenillas JF, Massot A, Alvarez-Sabín J, Fernandez-Cadenas I, del Rio-Espinola A, Chacon P, et al. C-Reactive Protein Gene C1444T Polymorphism and Risk of Recurrent Ischemic Events in Patients with Symptomatic Intracranial Atherostenoses. *Cerebrovasc Dis* 2009; 28: 95–102.

Barnes EV, Narain S, Naranjo A, Shuster J, Segal MS, Sobel ES, et al. High sensitivity C-reactive protein in systemic lupus erythematosus: relation to disease activity, clinical presentation and implications for cardiovascular risk. *Lupus* 2005; 14: 576–582.

Bertoli A, Vilá LM, Reveille JD, Alarcón GS. Systemic Lupus Erythematosus in a Multiethnic US Cohort (LUMINA): LXI. Value of C-Reactive Protein as a Marker of Disease Activity and Damage. *J Rheumatol* 2008; 35: 2355-2358.

Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Christian CL. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am J Med* 1975; 59: 533-552.

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index of lupus patients. The Committee on prognosis studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630–640.

Brazil. Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). Characteristics of the population and households: results of the universe. 2010. [http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas\\_da\\_populacao/default\\_caracteristicas\\_da\\_populacao.shtm](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm). (Accessed 20 Nov 2013).

Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, et al. Human *CRP* gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23: 2063–2069.

Busti AJ, Hooper JS, Amaya CJ, Kazi S. Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. *Pharmacotherapy* 2005; 25: 1566-1591.

Carlson C, Aldred S, Lee P, Tracy R, Schwartz S, Rieder M, et al. Polymorphisms within the C-Reactive Protein (*CRP*) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 64–77.

Crawford D, Yi Q, Smith J, Shephard C, Wong M, Witrak L, et al. Allelic spectrum of the natural variation in CRP. *Hum Genet* 2006; 119: 496–504.

Croker JA, Kimberly RP. Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 529-537.

D'Aiuto F, Casas JP, Shah T, Humphries SE, Hingorani AD, Tonetti MS. C-reactive protein (+1444C>T) polymorphism influences CRP response following a moderate inflammatory stimulus. *Atherosclerosis* 2005; 179: 413–417.

Danik JS, Ridker PM. Genetic determinants of C-Reactive Protein. *Curr Atheroscler Rep* 2007; 9: 195–203.

Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 311–318.

Delongui F, Kallaur AP, Oliveira SR, Bonametti AM, Grion CMC, Morimoto HK, et al. Serum levels of high sensitive C-reactive protein in healthy adults from southern Brazil. *J Clin Lab Anal* 2013; 27: 207–210.

Du Clos TW, Zlock LT, Rubin RL. Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin. *J Immunol* 1988; 141: 4266-4270.

Eklund C, Lehtimäki T, Hurme M. Epistatic effect of C-reactive protein (*CRP*) single nucleotide polymorphism (SNP) +1059 and interleukin-1B SNP +3954 on CRP concentration in healthy male blood donors. *Int J Immunogenet* 2005; 32: 229-232.

Eudy AM, Vines AI, Dooley MA, Cooper GS, Parks CG. Elevated C-reactive protein and self-reported disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014; 23: 1460–1467.

Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: Implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2000; 192: 1353-1364.

Grammer TB, März W, Renner W, Böhm BO, Hoffmann MM. C-reactive protein genotypes associated with circulating C-reactive protein but not with angiographic coronary artery disease: the LURIC study. *Eur Heart J* 2009; 30: 170–182.

Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1241–1250.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.

Jonsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the *CRP* and *FcγRIIIa* genes. *Rheumatology* 2007; 46: 1417-1421.

Kim HA, Chun HY, Kim SH, Park HS, Suh CH. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms in Disease Susceptibility and Clinical Manifestations of Korean Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2009; 36: 2238-2243.

Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MGE, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1491-1503.

Kovacs A, Green F, Hansson LO, Lundman P, Samnegard A, Boquist S, et al. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein

gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2005; 178: 193-198.

Lee SS, Singh S, Link K, Petri M. High-sensitivity C-Reactive Protein as an associate of clinical subsets and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38: 41-54.

Linares LF, Gomez-Reino JJ, Carreira PE, Morillas L, Ibero I. C-reactive protein (CRP) levels in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Rheumatol* 1986; 5: 66-69.

Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol* 2005; 117: 104-111.

Morita A, Nakayama T, Doba N, Hinohara S, Soma M. Polymorphism of the C-Reactive Protein (*CRP*) Gene Is Related to Serum CRP Level and Arterial Pulse Wave Velocity in Healthy Elderly Japanese. *Hypertens Res* 2006; 29: 323-331.

Moser KL, Neas BR, Salmon JE, Yu H, Gray-McGuire C, Asundi N, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14869–14874.

Nath SK, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 794-800.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FdeS, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; 6: e17063.

Pepys MB, Lanham JG, De Beer FC. C-reactive protein in SLE. *Clin Rheum Dis* 1982; 8: 91–103.

Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2677-2686.

Petri M. Systemic lupus erythematosus: 2006 update. *J Clin Rheumatol* 2006; 12: 37–40.

Pisetsky DS. Anti-DNA and autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 364–368.

Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 39: 257-268.

Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008; 358: 929–939.

Rhodes B, Meek J, Whittaker JC, Vyse TJ. Quantification of the genetic component of basal C-reactive protein expression in SLE nuclear families. *Ann Hum Genet* 2008; 72: 611-620.

Rhodes B, Merriman ME, Harrison A, Nissen MJ, Smith M, Stamp L, et al. A genetic association study of serum acute-phase C-reactive protein levels in Rheumatoid Arthritis: implications for clinical interpretation. *PloS Med* 2010; 7: e1000341.

Robey FA, Jones KD, Tanaka T, Liu TY. Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J Biol Chem* 1984; 259: 7311-7316.

Rordorf C, Schnebli H, Baltz M, Tennent G, Pepys M. The acute-phase response in (NZB X NZW) F1 and MRL/l mice. *J Exp Med* 1982; 156: 1268–1273.

Russell AI, Cunninghame Graham DS, Shepherd C, Robertson CA, Whittaker J, Meeks J, et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 137-147.

Shai R, Quismorio FPJr, Li L, Kwon OJ, Morrison J, Wallace DJ, et al. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 639–644.

Shih PB, Manzi S, Shaw P, Kenney M, Kao AH, Bontempo F, et al. Genetic variation in C-reactive protein (*CRP*) gene may be associated with risk of systemic lupus erythematosus and CRP concentrations. *J Rheumatol* 2008; 35: 2171-2178.

Szalai AJ. C-reactive protein (CRP) and autoimmune disease: Facts and conjectures. *Clin Dev Immunol* 2004; 11: 221-226.

Urowitz MB, Gladman DD. Accelerated atheroma in lupus background. *Lupus* 2000; 9: 161-165.

Williams RC Jr, Harmon ME, Burlingame R, Du Clos TW. Studies of serum C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2005; 32: 454-461.

Yan M, Zhao L, Zheng F, Sun X, Zhang Y, Wang C. The relationship between gene polymorphism and CRP level in a Chinese Han population. *Biochem Genet* 2007; 45: 1-9.

**ARTIGO 2****INFLUENCE OF RS1800947 C-REACTIVE PROTEIN POLYMORPHISM ON SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS SUSCEPTIBILITY, DISEASE ACTIVITY, AND C-REACTIVE PROTEIN CONCENTRATIONS**

**Francieli Delongui<sup>1</sup>, Marcell Allyson Batisti Lozovoy<sup>2</sup>, Tatiana Mayiumi Veiga Iriyoda<sup>3,4</sup>, Neide Tomimura Costa<sup>1,3</sup>, Nicole Perugini Stadtlober<sup>4</sup>, Daniela Frizon Alfieri<sup>1</sup>, Tamires Flauzino<sup>1</sup>, Isaias Dichi<sup>5</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>2</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>2</sup>**

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

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

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

<sup>4</sup>Experimental Pathological Postgraduate Program, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

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

**Acknowledgments**

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

**Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## ABSTRACT

**Objective:** The objective of this study was to evaluate the association between the rs1800947 *C-reactive protein (CRP)* genetic polymorphism with the susceptibility for systemic lupus erythematosus (SLE) and disease activity, as well as with CRP serum levels in SLE Brazilian patients.

**Methods:** The study enrolled 183 SLE patients and 138 healthy controls. Clinical and laboratorial characteristics were evaluated and SLE disease activity was assessed (SLEDAI) that classified them with active disease (SLEDAI  $\geq$  6) and inactive disease (SLEDAI  $<$  6). The rs1800947 *CRP* polymorphism was determined using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.

**Results:** The binary logistic regression showed that SLE patients presented higher body mass index ( $p=0.015$ ), CRP ( $p=0.045$ ) and interleukin (IL)-6 ( $p<0.0001$ ), as well as lower tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  ( $p<0.0001$ ) and C4 complement ( $p=0.028$ ) serum levels compared to controls. The frequency of GG vs. GC+CC genotypes and G vs. C alleles among patients did not differ from controls [GG vs. GC+CC= odds ratio (OR): 0.846, 95% confidence interval (CI): 0.383-1.869,  $p=0.830$ ; G vs. C= OR: 0.933, 95% CI: 0.438-1.988,  $p=0.990$ ]. Patients carrying the GC genotype presented a significantly higher frequency of unmedicated with antimalarial drugs ( $p=0.013$ ), as well as a trend toward lower anti-dsDNA serum levels ( $p=0.068$ ) compared with patients carrying the GG genotype. However, the SLEDAI values did not differ between patients with GG or GC genotypes ( $p=0.372$ ).

**Conclusion:** Our data showed that rs1800947 *CRP* polymorphism was not significantly associated with either susceptibility for SLE or disease activity, as well as with the CRP serum levels in SLE patients from Southern Brazil, suggesting that this genetic variant may not play a role, by itself, in the pathophysiology of the SLE in this population.

**KEYWORDS:** Systemic lupus erythematosus; genetic polymorphism; C-reactive protein.

## INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic systemic autoimmune disease characterized by the presence of autoantibodies primarily directed against nuclear, cytoplasmic, and circulating autoantigens (Petri, 2006). The disease is also characterized by alternating periods of remission and disease activity, mainly expressed by flare occurrence. Patients may present a variety of clinical manifestations and immunological features due the numerous organs that may be involved with activity or damage, such as skin, joints, kidneys,

lungs, heart, and brain (Cervera et al, 2014). It is believed that impaired handling of antigen-antibody complexes and subsequent tissue deposition leading to release of inflammatory mediators and an array of inflammatory cells can induce a broad spectrum of clinical manifestations (Kyttaris et al, 2005). In particular, the handling of apoptotic cell debris is thought to be important in the promotion and development of autoantibodies in patients with SLE (Edberg et al, 2008).

The etiology and the underlying pathophysiologic mechanisms that trigger the autoimmune response in SLE remain unknown (Fortuna and Brennan, 2013). Interactions among environmental factors such as sunlight, drugs and virus, as well as hormones and multiple genes could trigger the disorder, but no one cause has been identified (Cruz et al, 2007; Shih et al, 2008). Genome-wide association studies have revealed approximately 30 to 40 gene loci with polymorphisms that predispose to SLE (Rhodes et al, 2008; Moser et al, 2009). In particular, a region on the long arm of chromosome 1, called 1q23-24, is linked with SLE in many populations, and the gene for C-reactive protein (CRP) have been mapped to 1q23-24, the so-called pentraxin locus (Cruz et al, 2007).

*CRP* is a candidate gene to be investigated as a susceptibility locus for SLE based both on the physiological activity of its products and on this unique position (Shih et al, 2008). CRP is an important liver-derived acute-phase protein that can increase up to 1000-fold in serum as a response to diverse stimuli such as infection or injury (Kushner, 1988) but, in SLE patients, there is little or no increase of CRP level with flare-up of the disease (Kim et al, 2009). Clinically, active disease is accepted to be characterized by normal CRP concentrations (Cruz et al, 2007), and when elevated CRP levels are detected, they are indicative of an intercurrent infection rather than an active lupus (Russell et al, 2004; Jonsen et al, 2007; Edberg et al, 2008; Shih et al, 2008).

The role that CRP plays in SLE is still controversial. It has been postulated that this protein has not only inflammatory, but also anti-inflammatory properties (Bertoli et al, 2008). CRP is important in clearing apoptotic cell debris, binding to apoptotic cell surfaces, promoting activation of the early classical complement pathway, improving the opsonization and phagocytosis of apoptotic material, therefore inducing an anti-inflammatory response, and, maybe, preventing autoimmunity (Marnell et al, 2005). These findings raise the possibility that decreased amounts of CRP may contribute to the pathogenesis of SLE (Kim et al, 2009).

*CRP* has been considering as a promising susceptibility gene for SLE (Shih et al, 2008). The *CRP* is comprised of 2 exons separated by a single intron (Woo et al, 1985).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are a very common variant at *CRP*, and each of them seems to affect the CRP serum levels at different ways (Rhodes et al, 2010).

The rs1800947 SNP is located in the second exon of the *CRP* and several studies have been shown that the variant C allele is associated with lower serum levels of CRP than the G allele in inflammatory conditions, such as cardiovascular heart disease (Zee and Ridker, 2002; Suk Danik et al, 2006). The role of the rs1800947 polymorphism on the CRP serum levels and its association with susceptibility for SLE is still not determined. While some studies showed an association with risk effect for disease susceptibility (Russell et al, 2004; Edberg et al, 2008), others did not confirm this effect (Shih et al, 2008; Kim et al, 2009). We hypothesized that this polymorphism, which seems be associated with low serum levels of CRP, could exert a risk role for SLE susceptibility and disease activity. In order to address this question, the aim of the present study was to evaluate the association between the rs1800947 polymorphism with the susceptibility for SLE and disease activity, as well as with the serum levels of CRP and other inflammatory markers in Southern Brazilian population.

## **MATERIALS AND METHODOS**

### **Subjects**

A total of 183 unrelated SLE patients, diagnosed according to the American College of Rheumatology criteria for SLE (Hochberg, 1997; Petri, 2012), were consecutively recruited, between 2009 and 2015, from the Specialized Outpatient Department of University Hospital, State University of Londrina, Paraná State, Southern Brazil. As control group, 138 unrelated healthy blood donors from the same region of SLE patients were recruited during the same period from the Blood Bank of Londrina. No patient studied was judged to have concomitant clinically apparent infections at the time of samples collections. No control subject had clinical evidence of concomitant infection, autoimmunity, or inflammatory diseases.

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

### **Demographic, clinical, and laboratory characteristics**

Demographic and clinical data were obtained using a standard questionnaire and medical records. Anthropometric measurements, such as body weight and height were evaluated. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m)

squared. Ethnicity was classified according to individual's self-perception in Caucasian and non-Caucasian (Brazil, 2010). Disease activity was assessed using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI). The patients were categorized as inactive SLE when SLEDAI < 6 and active SLE when SLEDAI  $\geq$  6 (Bombardier et al, 1992).

Peripheral blood samples were collected with EDTA as anticoagulant and without anticoagulant after 12 hours fasting. All samples were immediately centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes and the buffy-coat aliquots were stored at -20°C, while plasma and serum aliquots were stored at -80°C for posterior analyzes. The samples were consecutively identified by number to guarantee the confidentiality. The serum levels of CRP (detection limit of <0.175 mg/L) and complement components (C3 and C4) were determined using a nephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany), and expressed as mg/L and mg/dL, respectively; interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IL-10 serum levels were measured using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA). Antinuclear antibodies (ANA) were quantified using indirect immunofluorescence assay (IFA) with HEp2 cells as substrate (IFA-ANA-HEp2-IgG, VIRO-IMMUN LaborDiagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and considered significant when titers  $\geq$  1:160; anti-dsDNA antibodies were quantified using enzyme-linked immunoassay (ELISA, anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and considered significant when titers  $\geq$  20 IU/mL; and anti-nucleosome antibodies were evaluated using ELISA (anti-nucleosome, Orgentec Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and values  $\geq$  20 U/mL were considered positive. Peripheral white blood cell counts were also quantified using an automatic method and expressed as cells/mm<sup>3</sup>.

### **rs1800947 *CRP* genetic polymorphism**

Genomic DNA was extracted from buffy coat of peripheral blood cells using a resin column procedure (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brazil). One hundred ng of DNA were used to amplify a 744 base pair (bp) fragment of the *CRP* by polymerase chain reaction (PCR) as previously reported (Cao and Hegele, 2000; Thalmaier et al, 2006) with some modifications. Briefly, the primers used were determined according to the GenBank n° M11880.1 (Thalmaier et al, 2006) as follows: primer forward (*CRP* +1059 sense) 5' GAT CTG TGT GAT CTG AGA AAC CTC T 3'; primer reverse (*CRP* +1059 antisense) 5' GAG GTA CCA GAG ACA GAG ACG TG 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). PCR was performed with a final volume of 25  $\mu$ L, with 0.15 mM of each primer, 1.50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.10 mM dNTP, 1.25 units thermostable DNA polymerase (Invitrogen™, Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 100 ng of the DNA sample. PCR conditions were performed in a thermocycler (Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA), and comprised of 5 min denaturation at 95°C for initial denaturation; 37 cycles of 45 sec at 95°C for denaturation, 45 sec at 70°C for the annealing and 45 sec at 72°C for the elongation; and 10 min at 72°C for final elongation. In all PCR analyses, a negative control (without a DNA sample) was included.

The PCR products were subjected to restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis as described previously (Cao and Hegele, 2000; Thalmaier et al, 2006) with some modifications. Briefly, 10 µL of the PCR product were completely digested with 1.5 units of *MaeIII* (5 U/µL) enzyme (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) for 4 h at 55°C. Further, 10 µL of the digested samples were analyzed by electrophoresis on a 3% agarosis gel (70V, 90-100 minutes) and stained with ethidium bromide during 30 min. The electrophoresis profile was captured and recorded by the photo documentation system L-PIX-HE (Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil). The G allele includes two restriction sites for *MaeIII*, which results in 310bp, 233bp, and 201bp fragments after digestion, and the C allele (lacking only one restriction site for *MaeIII*) results in fragments of 310bp and 434bp. The heterozygous genotype results in four fragments (434, 310, 233 and 201bp).

### **Statistical analysis**

Categorical variables were analyzed using a Chi-square test, or Fisher Exact test when appropriate, and they were expressed as absolute (n) and relative (%) numbers. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Natural logarithmic of continuous data (BMI, CPR, C3, C4, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ ) was used in the analyses when the variables were not normally distributed. Continuous variables were analyzed using Student's *t* test, and they were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean ( $\pm$ SEM). The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also determined to evaluate case-control study association. Allelic and genotypic frequencies were tested in Hardy-Weinberg equilibrium using the Chi-square test. The association between cases and controls and between demographic, laboratory, and clinical variables obtained in patients was evaluated using the dominant genetic model (GG vs. GC+CC). Binary logistic regression analysis was made to evaluate whether the variables that presented  $p < 0.10$  were independently associated with SLE. The results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . The statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) Programs.

## RESULTS

The demographic, clinical, and laboratory characteristics of the 183 SLE patients and 138 controls are presented in Table 1. As would be expected, patients and controls did not differ on age, sex, and ethnicity. When compared to controls, SLE patients presented higher BMI [mean 27.56 kg/m<sup>2</sup> ( $\pm$ 0.45) vs. mean 25.86 kg/m<sup>2</sup> ( $\pm$ 0.37),  $p=0.002$ ], CRP [mean 5.98 mg/L ( $\pm$ 0.83) vs. mean 3.53 mg/L ( $\pm$ 0.49),  $p=0.026$ ], IL-6 [mean 8.73 pg/mL ( $\pm$ 1.12) vs. mean 6.28 pg/mL ( $\pm$ 1.67),  $p<0.0001$ ] and IL-10 serum levels [mean 12.28 pg/mL ( $\pm$ 1.02) vs. mean 7.40 pg/mL ( $\pm$ 0.98),  $p=0.019$ ]. The values of TNF- $\alpha$ , C3 and C4 were lower on SLE patients compared with controls: mean 18.94 pg/mL ( $\pm$ 6.63) vs. mean 21.24 pg/mL ( $\pm$ 6.03),  $p=0.021$  for TNF- $\alpha$ , mean 112.60 mg/dL ( $\pm$ 2.00) vs. mean 120.40 ( $\pm$ 2.20),  $p=0.002$  for C3, and mean 21.14 mg/dL ( $\pm$ 0.78) vs. mean 23.83 mg/dL ( $\pm$ 0.80),  $p<0.0001$  for C4. Most of the SLE patients (73.77%) presented inactive disease (SLEDAI < 6), seropositivity for ANA (71.58%) with the nuclear speckled pattern of fluorescence (36.07%), seropositivity for anti-dsDNA (53.55%) autoantibodies, and most of them were treated with corticosteroids (92.35%) and antimalarial drugs (74.86%). After binary logistic regression analysis with the explanatory variables that presented  $p<0.10$ , BMI, CRP, IL-6, TNF- $\alpha$ , and C4 serum levels remained significant and were independently associated with SLE disease (Table 2).

The distribution of rs1800947 *CRP* genotypes and alleles were in Hardy-Weinberg equilibrium in both groups ( $p>0.05$ ), and are presented in Table 3. Among the SLE patients, 166 (90.71%) were GG, and 17 (9.29%) were GC+CC (none of the patients presented the CC genotype). In the control group, 127 (92.03%) were GG, and 11 (7.97%) were GC+CC (only one control presented the CC genotype). The dominant statistical model was used considering the low frequency of patients with CC genotype. There was no significant difference between the frequencies of GG vs. GC+CC genotypes (OR 0.846, 95% CI: 0.383– 1.869,  $p=0.830$ ) as well as between the G and C allele frequencies when SLE patients and controls were compared (G vs. C, OR 0.933, 95% CI: 0.438 – 1.988,  $p=0.990$ ).

The clinical and laboratory characteristics of the SLE patients according to rs1800947 *CRP* polymorphism were also analyzed considering the dominant model, as GG vs GC (Table 4). The SLE patients carrying the GC genotype presented a significantly higher frequency of unmedicated with antimalarial drugs ( $p=0.013$ ), as well as a trend toward lower anti-dsDNA serum levels [mean 35.85 IU/mL ( $\pm$ 8.88) vs. mean 56.02 IU/mL ( $\pm$ 5.93),  $p=0.068$ ], compared with patients carrying the GG genotype. However, other variables, such as serum levels of CRP, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, C3, C4, anti-nucleosome and leukocytes, as well as SLEDAI

values, did not differ between SLE patients according to their rs1800947 polymorphism ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

The main finding of the present study was that the rs1800947 *CRP* polymorphism was not associated with the susceptibility for SLE and disease activity, as well as with the CRP serum levels in SLE patients from Southern Brazil; however, patients carrying the GC genotype presented a significantly higher frequency of unmedicated with antimalarial drugs, as well as a trend toward lower anti-dsDNA serum levels compared with patients carrying the GG genotype. Other important result was that BMI, CRP, IL-6, TNF- $\alpha$  and C4 serum levels were independently associated with SLE disease. We will now discuss these findings on a point by point basis.

To our knowledge, this is the first study that investigates the association between rs1800947 polymorphisms with SLE susceptibility and disease activity in a Brazilian population. The overall distribution of rs1800947 *CRP* genotypes and allele frequency obtained in this cohort are in agreement with previous study that evaluated patients with SLE from USA (Shih et al, 2008) and Korea (Kim et al, 2009), as well as in patients with cardiovascular diseases (Zee and Ridker, 2002; Brull et al, 2003; Grammer et al, 2009), Crohn's disease (Thalmaier et al, 2006), rheumatoid arthritis (Rhodes et al, 2010), and healthy blood donors (Eklund et al, 2005).

Heritability estimates suggest that as much as 60.0% of the variance in baseline CRP levels is attributable to genetic variation (Carlson et al, 2005; Crawford et al, 2006). It is very likely that polymorphisms in genes controlling *CRP* expression influence CRP levels. Moreover, genetic variation at the *CRP* locus could influence SLE risk via its effect on CRP levels (Shih et al, 2008). Edberg et al (2008) reported that genetically determined lower levels of CRP could allow for alterations in the presentation of autoantigens to the immune system resulting in the generation of autoantibody production and autoimmunity. Moreover, a family-based study (Russell et al, 2004) proposed that low basal levels of CRP may predispose to antinuclear autoantibody production, which in turn contributes to the development of human lupus. Producing more CRP may offer benefits, perhaps by enhancing clearance of apoptotic cells and reducing susceptibility to systemic autoimmunity. However, excessive CRP production may also have deleterious consequences, by promoting inflammation and tissue damage in unwanted situations (Rhodes et al, 2010).

The role of the rs1800947 polymorphism has been investigated on SLE susceptibility and on the CRP serum levels in SLE patients, but the results remained conflicting. While some studies suggested that low levels of CRP that were associated with this polymorphism could be a risk effect for disease susceptibility (Russell et al, 2004; Edberg et al, 2008), others did not confirm this effect (Shih et al, 2008; Kim et al, 2009). Since the rs1800947 is a silent mutation in the exon 2 of the *CRP* (Cao e Hegele, 2000), it may be in linkage disequilibrium with a yet-to-be-identified, functional mutation in the *CRP*, or a nearby gene, that is responsible for the expressed concentrations of CRP, especially with those in the promoter region (Zee e Ridker, 2002).

Our results are in agreement with Shih et al (2008) and Kim et al (2009) that showed no significant differences in allelic and genotypic frequencies of the rs1800947 polymorphism between SLE and controls, as well as no differences between CRP serum levels and genotypes of this polymorphism. However, our results are in disagreement from other studies (Russell et al, 2004; Edberg et al, 2008). Russell et al (2004) reported significant association between the variant C allele of this polymorphism with decreased CRP level in a British SLE cohort, but not with the risk of SLE. Edberg et al (2008), in a cohort of SLE patients from USA, observed a suggestive association between the rs1800947 polymorphism and SLE in the Caucasian population, but not in African-Americans.

The role of this polymorphism affecting the CRP serum levels and their risk with other autoimmune diseases also remained conflicting. While one study suggested that low levels of CRP were associated with rs1800947 polymorphism and with the risk for rheumatoid arthritis (Rhodes et al, 2010), other did not confirm this effect studying Crohn's disease (Thalmaier et al, 2006). Eklund et al (2005) showed that in healthy blood donors from Finland, men subjects carrying the GC or CC genotype of the rs1800947 polymorphism presented significant lower CRP levels than subjects carrying the GG genotype. They could not detect any significant associations between these genotypes and CRP levels in women. It is interest that this association was found only in males and the reason might be the female hormones. SLE patients enrolled in the present study were predominantly women (93.44%), and maybe this is one of the reasons that could explain the lack of association obtained in our study. Probably, the CRP serum levels modulation by the female hormones could be stronger than the modulation by rs1800947 polymorphism.

Moreover, Shih et al (2008) reported numerous facts that could explain the lack of association between rs1800947 *CRP* polymorphism and decreased CRP in their SLE patients, as well as we found in our study. First, it may be attributed to the limited sample size of the

minor allele carriers, since the variant C allele is rare; second, it may be confounded by the effects from anti-inflammatory medications that patients with SLE take on regular basis, like corticosteroids; and third, it may be result from years of SLE insult from the chronic inflammatory state.

Variation in the *CRP* gene modifies SLE risk via unidentified mechanisms. It seems that no single gene polymorphism is involved in the SLE pathogenesis; it is a combination of susceptibility genes and absence of protective genes. Moreover, it remains a possibility that *CRP* itself does not directly contribute to SLE susceptibility, rather one or more as yet unidentified SLE susceptibility alleles in nearby loci may be in strong linkage disequilibrium with one or more of the *CRP* SNPs (Shih et al, 2008). Our results, as well as previous study (Shih et al, 2008), may indicate that the SNP may not act by itself, but exert their effects via different kinds of activity or interactions with others proteins. Further, complex diseases and traits (such as SLE and CRP levels) are likely to be influenced by multiple genes, each exerting effects in a small to modest range (Consortium, 2007).

The imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines is a hallmark of the pathogenesis of SLE. Role of pro-inflammatory cytokines in pathogenesis of SLE is controversial. It has been demonstrated that pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 show altered levels in SLE patients (Umare et al, 2014). Moreover, CRP has several putative immunomodulating abilities, such as induction of IL-10 production, inhibition of pro-inflammatory cytokines including TNF- $\alpha$  and inhibition of T-cell proliferation (Szalai, 2004). IL-6 induces CRP expression in the liver during the acute phase response, and the *CRP* promoter contains several IL-6 response elements (Li et al, 1990).

Besides the higher CRP serum levels, the SLE patients evaluated in the present study also exhibited higher BMI and IL-6 serum levels, factors that could influence the CRP levels obtained. However, our results showed that the association between the elevated CRP on SLE patients was independently from other variables, including BMI and IL-6 levels. It is in agreement with previous studies (Bertoli et al, 2008; Eudy et al, 2014), who observed that most SLE patients have elevated CRP levels during the evolution of the disease process, irrespective of concomitant active infection. Eudy et al (2014), provides evidence that higher CRP levels were associated with an increased prevalence of self-reported flares at baseline and flares after 39 months follow-up. Hence, in addition to being a marker of current disease status, their findings suggest that CRP may also predict future disease activity. Moreover, a significant association between CRP and disease activity and damage in major organs and systems from a multiethnic North American cohort was also reported (Bertoli et al, 2008).

In our study, increased IL-6 and decreased TNF- $\alpha$  serum levels were independently associated with SLE disease. Our results are in agreement, at least in part, with previous studies (Sabry et al, 2006; Umare et al, 2014) that found that SLE patients exhibit significantly elevated serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  when compared to healthy controls. We found that SLE patients presented higher IL-6 serum levels than controls, but we failure to detect elevated TNF- $\alpha$  serum levels in SLE patients. This apparent discrepancy may be explained by some factors. First, the TNF- $\alpha$  does not represent the concentration of this cytokine locally produced at the site of inflammation (Aggarval and Natarajan, 1996). Second, the detectable serum levels of TNF- $\alpha$  does not take into in count the membrane-bound form of TNF- $\alpha$ , which is up regulated in many cells, including endothelial cells and leukocytes of patients with multiple organ failure (Pellegrini et al, 1996).

Moreover, IL-10 serum levels did not differ between SLE patients and controls after binary logistic regression analysis. It is in disagreement with previous studies (Tournoy et al, 2000; Yin et al, 2014), that showed higher levels of IL-10 in SLE patients when compared with controls. Probably the discrepancies in results among studies can also be explained by the variation in laboratory methods in performing the analysis, the time of the sample collection or the control population selected.

Our results showed that BMI were independently associated with SLE disease. This finding is in agreement with preview study (Oeser et al, 2005), where two thirds of patients with SLE are either overweight or obese. It could be explain, since SLE patients take immunosuppressive therapy on regular basis, which has weight gain as one of the numerous adverse effects (Busti et al, 2005). These obese patients are more likely to experience poorer functional capacity, impaired health-related quality of life, higher levels of fatigue, and worse pain (Oeser et al, 2005).

There is no consensus in the literature regarding the most accurate or useful marker of SLE disease activity. Individual markers, such as low levels of C3 and C4 or high anti-dsDNA antibody titer, or comprehensive activity index, such as SLEDAI, have been used in clinical practice or clinical trials to arrive at an accurate assessment of clinically significant immune system activation (Kirou et al, 2005). In the present study, we found that decreased C4 serum levels were independently associated with SLE disease, but this association was not observed with C3 serum levels; moreover, most of our patients presented SLEDAI < 6, indicating an inactive disease. It is in agreement with preview study (Birmingham et al, 2010), that showed that lower C4 levels, but not C3 levels, significantly forecasted a renal flare. These observation suggest that the events that trigger renal flare in this immune complex

disease involve classical pathway activation at least two months before clinical manifestation of the renal flare. In contrast, the finding that lower C3 levels significantly marked a renal flare in the absence of lower C4 levels suggest that the actual tissue damage that is manifested clinically as a renal flare involves amplified C3 activation, and thus predominantly the alternative pathway.

The rs1800947 polymorphism was not associated with the classical markers of SLE activity. However, we found that SLE patients carrying the GC genotype presented a trend toward lower anti-dsDNA serum levels and a significantly high frequency of patients unmedicated with antimalarial drugs compared with those carrying the GG genotype, but they did not differ between CRP serum levels. These results suggest that patients with the GC genotype may present a profile compatible with lower disease activity compared to patients with the GG genotype. This hypothesis underscores further studies with large number of SLE patients to a better evaluation of the role of this genetic variant in SLE pathophysiology.

The demographic and clinical characteristics of the patients of the present study are consistent with previous studies, such as sex and age (Jonsen et al, 2007; Edberg et al, 2008; Borba et al, 2013; Mozo et al, 2014; Yin et al, 2014), ethnicity (Borba et al, 2013; Mozo et al, 2014), low SLEDAI (Mozo et al, 2014), age at onset of disease (Borba et al, 2013), and disease duration (Jonsen et al, 2007; Shih et al, 2008; Borba et al, 2013). The low SLEDAI presented by the most of our SLE patients is probably a result of the SLE therapy used by them at the time of inclusion in the study. Although SLE is more frequent in Asiatic and Black individuals, our cohort is composed predominantly of Caucasians. However, we recognize that, although patients self-reported white European ancestry and most of Brazilians are European-descendants, there may be subtle differences in population ancestry, particularly because our population is one of the most genetically heterogenous worldwide (Pena et al, 2011).

The findings of the present study should be interpreted in the context of its limitations. The first major problem for analyzing the data are potential type 2 errors related to the very low genotype frequency of CC homozygous carriers in the population. One study reported the frequency of 91.5%, 8.4%, and 0.1% for the GG, GC, and CC, respectively (Thalmaier et al, 2006). Russell et al (2004) confirm that the weaker association with rs1800947 polymorphism in their study reflects the low allele frequency of this SNP. Given the overall low frequency of the homozygous CC genotype, larger trials are necessary to evaluate whether the homozygosity for the C allele is associated with SLE. Our sample size reduces our ability to detect genes with small effects, and thus, the lack of association between the rs1800947 *CRP*

polymorphism and SLE may be due to insufficient statistical power. Second, as circulating CRP is a sensitive acute-phase protein that could easily be fluctuated by multiple factors, longitudinal studies of CRP and SLE would be useful. Third, the study design was based on a specific SNP determination, which precludes the assessment of how other factors may impact on the complex relationship between *CRP* genotype, CRP level, as well as the susceptibility for SLE. Fourth, as an acute phase reactant, CRP increases with acute infection or trauma. Although patients with clinical inflammatory and infectious conditions were excluded from this study, it is always possible that subclinical diseases or minor trauma contributed to an elevation of the CRP serum levels.

In conclusion, our data showed that there was no association between the C allele of the rs1800947 *CRP* polymorphism with the susceptibility for SLE and disease activity, as well as with CRP serum levels in patients from Southern Brazil population, suggesting that this genetic variant may not play a role, by itself, in the pathophysiology of the SLE in this population.

**Table 1** Baseline characteristics of patients with systemic lupus erythematosus and healthy controls enrolled between 2009 and 2015 from Southern Brazilian population.

Characteristics	Controls (n=138)	SLE patients (n=183)	p value
Age (years) <sup>§</sup>	39.00 (1.00)	41.00 (1.00)	0.207
Sex*			
Female/Male	131 (94.93) / 7 (5.07)	171 (93.44) / 12 (6.56)	0.577
Ethnicity*			
Caucasian/Non-Caucasian	100 (72.46) / 38 (27.54)	117 (63.93) / 66 (36.07)	0.106
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>§</sup>	25.86 (0.37)	27.56 (0.45)	0.002
Age at onset of disease (years)	NA	31.06 (0.95)	
Disease duration (years)	NA	10.01 (0.56)	
SLEDAI			
< 6 (inactive disease)	NA	135 (73.77)	
≥ 6 (active disease)	NA	48 (26.23)	
C-reactive protein (mg/L) <sup>§</sup>	3.53 (0.49)	5.98 (0.83)	0.026
Interleukin-6 (pg/mL) <sup>§</sup>	6.28 (1.67)	8.73 (1.12)	<0.0001
TNF-α (pg/mL) <sup>§</sup>	21.24 (6.03)	18.94 (6.63)	0.021
Interleukin-10 (pg/mL) <sup>§</sup>	7.40 (0.98)	12.28 (1.02)	0.019
C3 (mg/dL) <sup>§</sup>	120.40 (2.20)	112.60 (2.00)	0.002
C4 (mg/dL) <sup>§</sup>	23.83 (0.80)	21.14 (0.78)	<0.0001
ANA			
Negative (<1:160)	NA	52 (28.42)	
Positive (≥1:160)	NA	131 (71.58)	
ANA pattern			
Nuclear speckled	NA	66 (36.07)	
Nuclear homogeneous	NA	44 (24.04)	
Other#	NA	18 (9.84)	
Anti-dsDNA (IU/mL)			
Negative (<20 IU/mL)	NA	85 (46.45)	
Positive (≥20 IU/mL)	NA	98 (53.55)	
Characteristics	Controls (n=138)	SLE patients (n=183)	p value

## Therapy

Corticosteroids (mg/day)	NA	12.18 (0.86)
Corticosteroids (yes/no)	NA	169 (92.35) / 14 (7.65)
Antimalarial (yes/no)	NA	137 (74.86) / 46 (25.14)
Immunosuppressor (yes/no)	NA	72 (39.34) / 111 (60.66)

---

\*Categorical data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and were analyzed using Chi-Square test. <sup>§</sup>Continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean ( $\pm$ SEM) and were analyzed using Student's *t* test; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI: Systemic Lupus Erythemathosus Disease Activity Index; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha; C3: complement 3; C4: complement 4; ANA: antinuclear antibodies; anti-dsDNA: anti-double stranded DNA antibodies; # Other: Nuclear Centromere, Nucleolar, and Citoplasmic immunofluorescence patterns; NA: not applicated.

**Table 2** Results of the binary logistic regression analysis between systemic lupus erythematosus and controls (reference) and explanatory variables.

<b>Parameters</b>	<b>B</b>	<b>Wald</b>	<b>df</b>	<b>p</b>	<b>Odds Ratio (95% CI)</b>
CRP (mg/L)	0.353	4.001	1	0.045	1.424 (1.007 – 2.013)
C3 (mg/dL)	-2.004	2.754	1	0.097	0.135 (0.013 – 1.437)
C4 (mg/dL)	-1.220	4.839	1	0.028	0.295 (0.100 – 0.875)
IL-6 (pg/mL)	0.956	21.304	1	<0.0001	2.600 (1.733 – 3.902)
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	-0.707	17.640	1	<0.0001	0.493 (0.355 – 0.686)
IL-10 (pg/mL)	0.048	0.074	1	0.785	1.049 (0.742 – 1.484)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	2.869	5.931	1	0.015	17.622 (1.751 – 177.347)

CI: confidence interval; CRP: C-reactive protein; C3: complement 3; C4: complement 4; IL-6: interleukin-6; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha; IL-10: interleukin-10; BMI: body mass index.

**Table 3** Frequency of rs1800947 *C-reactive protein* polymorphism obtained from patients with systemic lupus erythematosus and healthy controls from Southern Brazilian population.

Overall rs1800947 polymorphism				
	Controls (n=138)	SLE patients (n=183)	p value	Odds Ratio (95% CI)
GG	127 (92.03)	166 (90.71)		Reference
GC+CC	11 (7.97)	17 (9.29)	0.830	0.846 (0.383– 1.869)
G allele	264 (95.65)	349 (95.36)		Reference
C allele	12 (4.35)	17 (4.64)	0.990	0.933 (0.438 – 1.988)

Categorical data were expressed as absolute number (n) and percentage (%); the distribution of genotypes and allelic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls (chi-square test,  $p > 0.05$ ). CRP: C-reactive protein; SLE: systemic lupus erythematosus; CI: confidence interval; GG: homozygous genotype for the G allele; GC: heterozygous genotype; CC: homozygous genotype for the C allele; G: allele with two restriction sites of the *MaeIII* enzyme; C: allele with one restriction site of the *MaeIII* enzyme.

**Table 4** Baseline characteristics of systemic lupus erythematosus patients enrolled between 2009 and 2015 from Southern Brazilian population, according the rs1800947 *C-reactive Protein* polymorphism.

Characteristics	SLE patients (n=183)		
	GG (n=166)	GC (n=17)	p value
Age <sup>§</sup>	41.00 (±1.00)	42.00 (±3.00)	0.724
Sex (female/male)*	155 (93.37) / 11 (6.63)	16 (94.12) / 1 (5.88)	0.906
Ethnicity*			
Caucasian/Non-Caucasian	106 (63.86) / 60 (36.14)	11 (64.71) / 6 (35.29)	0.945
Body Mass Index (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>§</sup>	27.78 (±0.48)	25.53 (±1.23)	0.142
Age at onset of disease (years) <sup>§</sup>	31.00 (±1.00)	28.00 (±4.00)	0.330
Disease duration (years) <sup>§</sup>	9.80 (±0.60)	12.10 (±1.90)	0.238
SLEDAI <sup>§*</sup>	4.00 (±0.00)	4.00 (±1.00)	0.856
<6 (inactive disease)	124 (74.70)	11 (64.71)	0.372
≥6 (active disease)	42 (25.30)	6 (35.29)	
C-reactive protein (mg/L) <sup>§</sup>	6.12 (±0.91)	5.29 (±1.67)	0.665
Interleukin-6 (pg/mL) <sup>§</sup>	8.81 (±1.20)	7.92 (±3.01)	0.825
TNF-α (pg/mL) <sup>§</sup>	16.23 (±5.88)	47.55 (±45.25)	0.507
Interleukin-10 (pg/mL) <sup>§</sup>	12.27 (±1.07)	14.88 (±3.81)	0.525
C3 (mg/dL) <sup>§*</sup>	113.00 (±12.00)	105.00 (±8.00)	0.211
< 90mg/dL	32 (19.28)	5 (29.41)	0.500
≥ 90mg/dL	134 (80.72)	12 (70.59)	
C4 (mg/dL) <sup>§*</sup>	21.00 (±1.00)	20.00 (±2.00)	0.585
< 10mg/dL	16 (9.64)	3 (17.65)	0.393
≥ 10mg/dL	150 (90.36)	14 (82.35)	
ANA*			
<1:160	47 (28.31)	5 (29.41)	0.852
≥1:160	119 (71.69)	12 (70.59)	
ANA pattern*			
Nuclear speckled	60 (36.14)	6 (35.29)	0.884
Nuclear homogeneous	40 (24.10)	4 (23.53)	
Other#	17 (10.24)	1 (5.88)	

Anti-dsDNA (IU/mL) <sup>§*</sup>	56.02 (±5.93)	35.85 (±8.88)	0.068
< 20 IU/mL	76 (45.78)	9 (52.94)	0.820
≥ 20 IU/mL	90 (54.22)	8 (47.06)	
Anti-nucleosome(IU/mL) <sup>§</sup>	86.01 (±9.10)	97.11 (±32.14)	0.745
Leukocyte (x10 <sup>3</sup> cell/μL) <sup>§*</sup>	6.42 (±0.19)	7.16 (±0.99)	0.479
<3.00 (x10 <sup>3</sup> cell/μL)	6 (3.61)	1 (5.88)	0.501
≥3.00 (x10 <sup>3</sup> cell/μL)	160 (96.39)	16 (94.12)	
Therapy			
Corticosteroids (mg/day) <sup>§</sup>	12.20 (±0.90)	12.20 (±1.70)	0.993
Corticosteroids (yes/no) <sup>*</sup>	152 (91.57) / 14 (8.43)	17 (100.00) / 0 (0.00)	0.369
Antimalarial (yes/no) <sup>*&amp;</sup>	129 (77.71) / 37 (22.29)	8 (47.06) / 9 (52.94)	0.013
Immunosuppressors(yes/no) <sup>*</sup>	64 (38.55) / 102 (61.45)	8 (47.06) / 9 (52.94)	0.672

---

\*Categorical data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and were analyzed using Chi-Square test, or Fisher Exact test when appropriate. <sup>§</sup>Continuous data were expressed as mean ± standard error of mean (±SEM) and were analyzed using Student's *t* test; SLE: systemic lupus erythematosus; GG: homozygous genotype for the G allele; GC: heterozygous genotype; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha; C3: complement 3; C4: complement 4; ANA: antinuclear antibodies; anti-dsDNA: anti-double stranded DNA antibodies; # Other: Nuclear Centromere, Nucleolar, and Citoplasmic immunofluorescence patterns; & Odds Ratio: 3.922 (1.41-10.88).

## REFERENCES

- Aggarval BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7: 93-124.
- Bertoli A, Vilá LM, Reveille JD, Alarcón GS; LUMINA Study group. Systemic Lupus Erythematosus in a Multiethnic US Cohort (LUMINA): LXI. Value of C-Reactive Protein as a Marker of Disease Activity and Damage. *J Rheumatol* 2008; 35: 2355-2358.
- Birmingham DJ, Irshaid F, Nagaraja HN, Zou X, Tsao BP, Wu H, et al. The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare. *Lupus* 2010; 19: 1272-1280.
- Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index of lupus patients. The Committee on prognosis studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630-640.
- Borba EF, Araujo DB, Bonfá E, Shinjo SK. Clinical and immunological features of 888 Brazilian systemic lupus patients from a monocentric cohort: comparison with other populations. *Lupus* 2013; 22: 744-749.
- Brazil. Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) (2010) Characteristics of the population and households: results of the universe, [http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas\\_da\\_populacao/default\\_caracteristicas\\_da\\_populacao.shtm](http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm). (Accessed 20 Nov 2013).
- Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, et al. Human *CRP* gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23: 2063-2069.
- Busti AJ, Hooper JS, Amaya CJ, Kazi S. Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. *Pharmacotherapy* 2005, 25: 1566-1591.
- Cao H, Hegele RA. Human C-reactive protein (CRP) 1059G/C polymorphism. *J Hum Genet* 2000; 45: 100-101.

Carlson C, Aldred S, Lee P, Tracy R, Schwartz S, Rieder M, et al. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 64–77.

Cervera R, Doria A, Amoura Z, Khamashta M, Schneider M, Guillevin F, et al. Patterns of systemic lupus erythematosus expression in Europe. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 621–629.

Consortium. WTCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447: 661–678.

Crawford D, Yi Q, Smith J, Shephard C, Wong M, Wittrak L, et al. Allelic spectrum of the natural variation in CRP. *Hum Genet* 2006; 119: 496–504.

D’Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GRV. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007; 369: 587–596.

Edberg JC, Wu J, Langefeld CD, Brown EE, Marion MC, McGwin GJr, et al. Genetic variation in the *CRP* promoter: association with systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1147-1155.

Eklund C, Lehtimäki T, Hurme M. Epistatic effect of C-reactive protein (*CRP*) single nucleotide polymorphism (SNP) +1059 and interleukin-1B SNP +3954 on CRP concentration in healthy male blood donors. *Int J Immunogenet* 2005; 32: 229-232.

Eudy AM, Vines AI, Dooley MA, Cooper GS, Parks CG. Elevated C-reactive protein and self-reported disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014; 23: 1460–1467.

Fortuna G, Brennan MT. Systemic Lupus Erythematosus: Epidemiology, Pathophysiology, Manifestations, and Management. *Dent Clin N Am* 2013; 57: 631–655.

Grammer TB, März W, Renner W, Böhm BO, Hoffmann MM. C-reactive protein genotypes associated with circulating C-reactive protein but not with angiographic coronary artery disease: the LURIC study. *Eur Heart J* 2009; 30: 170–182.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.

Jonsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and Fcγ3R genes. *Rheumatology* 2007; 46: 1417-1421.

Kim HA, Chun HY, Kim SH, Park HS, Suh CH. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms in Disease Susceptibility and Clinical Manifestations of Korean Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2009; 36: 2238-2243.

Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MGE, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1491-1503.

Kushner I. The acute phase response: An overview. *Methods Enzymol* 1988; 163: 373–383.

Kyttaris VC, Katsiari CG, Juang YT, Tsokos GC. New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2005; 7: 469–475.

Li SP, Liu TY, Goldman ND. Cis-acting elements responsible for interleukin-6 inducible C-reactive protein gene expression. *J Biol Chem* 1990; 265: 4136–4142.

Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol* 2005; 117: 104-111.

Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009; 10: 373–379.

Mozo L, López P, Caminal-Montero L, Rodríguez-Carrio J, Suárez A. Anti-ribosomal P antibodies are associated with elevated circulating IFNα and IL-10 levels in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2014; 23: 1477–1485.

Oeser A, Chung CP, Asanuma Y, Avalos I, Stein CM. Obesity is an independent contributor to functional capacity and inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3651-3659.

Pellegrini JD, Puyana JC, Lapchak PH, Kodys K, Millergraziano CL. A membrane TNF-alpha/TNFRratio correlates to MODS score and mortality. *Shock* 1996; 6: 389-396.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FdeS, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; 6: e17063.

Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2677-2686.

Petri M. Systemic lupus erythematosus: 2006 update. *J Clin Rheumatol* 2006; 12: 37-40.

Rhodes B, Merriman ME, Harrison A, Nissen MJ, Smith M, Stamp L, et al. A genetic association study of serum acute-phase C-reactive protein levels in Rheumatoid Arthritis: implications for clinical interpretation. *PloS Med* 2010; 7: e1000341.

Rhodes B, Vyse TJ. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 1603-1611.

Russell AI, Cunninghame Graham DS, Shepherd C, Robertson CA, Whittaker J, Meeks J, et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 137-147.

Sabry A, Sheashaa H, El-husseini A, Mahmoud K, Eldahshan KF, George SK, et al. Proinflammatory cytokines (TNF-a and IL-6) in Egyptian patients with SLE: Its correlation with disease activity. *Cytokine* 2006; 35: 148-153.

Shih PB, Manzi S, Shaw P, Kenney M, Kao AH, Bontempo F, et al. Genetic variation in C-reactive protein (*CRP*) gene may be associated with risk of systemic lupus erythematosus and CRP concentrations. *J Rheumatol* 2008; 35: 2171-2178.

Suk Danik J, Chasman DI, Cannon CP, Miller DT, Zee RY, Kozlowski P, et al. Influence of genetic variation in the C-reactive protein gene on the inflammatory response during and after acute coronary ischemia. *Ann Hum Genet* 2006; 70: 705–716.

Szalai AJ. C-reactive protein (CRP) and autoimmune disease: facts and conjectures. *Clin Dev Immunol* 2004; 11: 221–226.

Thalmaier D, Dambacher J, Seiderer J, Konrad A, Schachinger V, Pfennig S, et al. The +1059G/C polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene is associated with involvement of the terminal ileum and decreased serum CRP levels in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1105–1115.

Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 775–783.

Umare V, Pradhan V, Nadkar M, Rajadhyaksha A, Patwardhan M, Ghosh KK, et al. Effect of Proinflammatory Cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ ) on Clinical Manifestations in Indian SLE Patients. *Mediators Inflamm* 2014; doi.org/10.1155/2014/385297.

Woo P, Korenberg JR, Whitehead AS. Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1985; 260: 13384-13388.

Yin Z, Huang J, He W, Cao Z, Luo X, Zhang C, et al. Serum level of eight cytokines in Han Chinese patients with systemic lupus erythematosus using multiplex fluorescent microsphere method. *Cent Eur J Immunol* 2014; 39: 228-235.

Zee RY, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis* 2002, 162: 217–219.

## 5 CONCLUSÕES

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- A frequência dos genótipos do polimorfismo rs1130864 encontrada nos pacientes com LES diferiu da observada nos controles, sendo 47,7% para o genótipo CC, 40,4% para o CT e 11,9% para o TT entre os pacientes e de 64,2% para o genótipo CC, 31,4% para o CT e 4,4% para o TT entre os controles; os indivíduos que apresentaram o genótipo CT e TT mostraram 1,73 e 3,67 vezes mais chance, respectivamente, de desenvolverem LES comparados aos indivíduos que apresentam o genótipo CC;
- Do mesmo modo, os indivíduos que apresentaram o alelo T mostraram 1,88 vezes mais chance de desenvolverem LES comparados aos indivíduos que apresentaram o alelo C;
- Os pacientes com LES apresentaram níveis séricos mais elevados de PCR quando comparados aos controles livres da doença e os níveis mais elevados de PCR também foram observados nos pacientes com LES que apresentaram, pelo menos, um alelo T (genótipos CT ou TT) do polimorfismo rs1130864; no entanto, este polimorfismo não apresentou associação com os marcadores de atividade da doença;
- Para o polimorfismo rs1800947, a frequência genotípica e alélica encontrada nos pacientes com LES não diferiu da observada nos controles e não apresentou associação com os níveis séricos de PCR e com os marcadores de atividade da doença;
- Os resultados sugerem que níveis elevados da PCR estão envolvidos na fisiopatologia do LES e que a variante alélica rs1130864 no gene da PCR pode ser um dos fatores genéticos associados a esta elevação.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sendo o LES uma doença complexa e clinicamente heterogênea, múltiplos genes estão envolvidos para o seu surgimento, e cada gene parece exercer uma pequena contribuição para o fenótipo total da doença. Portanto, as chances em identificar variantes genéticas que aumentam a susceptibilidade ao LES são menores que aquelas para fenótipos monogênicos. Além disto, interações entre vários genes e entre genes com fatores ambientais podem dificultar ainda mais a possibilidade de associação de uma variante genética particular com o fenótipo estudado, incluindo a genética da expressão da PCR.

É provável que SNPs específicos considerados *loci* genéticos candidatos ao LES, dois deles avaliados neste estudo, representem apenas parte da variação genética total do indivíduo que contribui para a heterogeneidade clínica da doença. As diferenças observadas nos nossos resultados mostram a dificuldade em associarmos variantes genéticas com doenças que apresentam fenótipos complexos. A identificação de outros genótipos ou haplótipos associados à susceptibilidade ao LES e aos marcadores da doença continua sendo um grande desafio para futuros estudos, na busca de um perfil genético que possa contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos do LES, assim como o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento dos pacientes com esta doença.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADABIMOHAB, R. et al. A. Does inflammation mediate the association between obesity and insulin resistance? **Inflammation**, doi 10.1007/s10753-016-0329-z, 2016.
- AGUILAR, F. et al., Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**, v. 30, p. 1770-1774, 2003.
- ALARCÓN-SEGOVIA, D. et al. Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus E. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. **Arthritis Rheum**, v. 52, p. 1138-1147, 2005.
- ANIC, F. et al. New classification criteria for systemic lupus erythematosus correlate with disease activity. **Croat Med J**, v. 55, p. 514-519, 2014.
- ARENILLAS, J.F. et al. C-Reactive Protein Gene C1444T Polymorphism and Risk of Recurrent Ischemic Events in Patients with Symptomatic Intracranial Atherostenoses. **Cerebrovasc Dis**, v. 28, p. 95–102, 2009.
- BALTUS, T.H. et al. CCR5 $\Delta$ 32 (rs333) polymorphism is associated with the susceptibility to systemic lupus erythematosus in female Brazilian patients. **Rheumatol Int**, v. 36, p. 7-15, 2016.
- BARNES, E.V. et al. High sensitivity c-reactive protein in systemic lupus erythematosus: Relation to disease activity, clinical presentation and implications for cardiovascular risk. **Lupus**, v. 14, p. 576–582, 2005.
- BASSUK, S.S.; RIFAI, N.; RIDKER, P.M. High-sensitivity C-reactive protein: clinical importance. **Curr Probl Cardiol**, v. 29, p. 439–493, 2004.
- BECKER, G.J. et al. Value of serum c-reactive protein measurement in the investigation of fever in systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 39, p. 50–52, 1980.
- BERNATSKY, S. et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 54, p. 2550–2557, 2006.
- BERTOUCHE, J.V. et al. C-reactive protein and serological indices of disease activity in systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 42, p. 655–658, 1983.
- BLOCK, S.R. et al. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. **Am J Med**, v. 59, p. 533–552, 1975.
- BOMBARDIER, C. et al. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index of lupus patients. The Committee on prognosis studies in SLE. **Arthritis Rheum**, v. 35, p. 630–640, 1992.
- BORBA, E.F. et al. Clinical and immunological features of 888 Brazilian systemic lupus patients from a monocentric cohort: comparison with other populations. **Lupus**, v. 22, p. 744–749, 2013.
- BORBA, E.F. et al. Consensus of Systemic Lupus Erythematosus. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, p. 196-207, 2008.
- BORCHERS, A.T. et al. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Rev**, v. 9, p. A277–A287, 2010.

BOTTO, M. et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. **Nat Genet**, v. 19, p. 56–59, 1998.

BRAZIL. **Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE)**. Characteristics of the population and households: results of the universe. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicasdapopulacao/default.shtm>. Acesso: 20 Nov. 2013.

BRULL, D.J. et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, p. 2063–2069, 2003.

CAO, H.; HEGELE, R.A. Human C-reactive protein (CRP) 1059G/C polymorphism. **J Hum Genet**, v. 45, p. 100–101, 2000.

CARLSON, C.S. et al. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. **Am J Hum Genet**, v. 77, p. 64–77, 2005.

CARROLL, M. Innate immunity in the etiopathology of autoimmunity. **Nat Immunol**, v. 2, p. 1089–1090, 2001.

CARVALHO, C. et al. CCR5-Delta32: implications in SLE development. **Int J Immunogenet**, v. 0, p. 1–6, 2013.

CERVERA, R. et al. Patterns of systemic lupus erythematosus expression in Europe. **Autoimmun Rev**, v. 13, p. 621–629, 2014.

CHAHADE, W.H. et al. Systemic lupus erythematosus in São Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. **Lupus**, v. 4, p. 100–103, 1995.

CHONG, W.P. et al. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. **Genes Immun**, v. 5, p. 484–492, 2004.

COURTNEY, P.A. et al. Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. **Lupus**, v. 8, p. 508–513, 1999.

CRISWELL, L. et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. **Am J Hum Genet**, v. 76, p. 561–571, 2005.

DANIK, J.S.; RIDKER, P.M. Genetic determinants of C-reactive protein. **Curr Atheroscler Rep**, v. 9, p. 195–203, 2007.

DAS CHAGAS MEDEIROS, M.M. et al. Clinical and immunological aspects and outcome of a Brazilian cohort of 414 patients with systemic lupus erythematosus (SLE): comparison between childhood-onset, adult-onset, and late-onset SLE. **Lupus**, doi:10.1177/0961203315606983, 2015.

D'CRUZ, D.P.; KHAMASHTA, M.A.; HUGHES, G.R. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v. 369, p. 587–596, 2007.

DEICHER, H.R.; HOLMAN, H.R.; KUNKEL, H.G. The precipitin reaction between DNA and a serum factor in systemic lupus erythematosus. **J Exp Med**, v. 109, p. 97–114, 1959.

DELONGUI, F. et al. Serum levels of high sensitive C-reactive protein in healthy adults from southern Brazil. **J Clin Lab Anal**, v. 27, p. 207–210, 2013.

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

DU CLOS, T.W.; ZLOCK, L.T.; RUBIN, R.L. Analysis of the binding of c-reactive protein to histones and chromatin. **J Immunol**, v. 141, p. 4266–4270, 1988.

DU CLOS, T.W. C-reactive protein reacts with the U1 small ribonucleoprotein. **J Immunol**, v. 143, p. 2553–2559, 1989.

DUPUIS, J. et al. Genome scan of systemic biomarkers of vascular inflammation in the Framingham Heart Study: evidence for susceptibility loci on 1q. **Atherosclerosis**, v. 182, p. 307–314, 2005.

EKLUND, C.; LEHTIMÄKI, T.; HURME, M. Epistatic effect of C-reactive protein (*CRP*) single nucleotide polymorphism (SNP) +1059 and interleukin-1B SNP +3954 on CRP concentration in healthy male blood donors. **Int J Immunogenet**, v. 32, p. 229–232, 2005.

ESKDALE, J. et al. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 49, p. 635–639, 1997.

FELD, J.; ISENBERG, D. Why and how should we measure disease activity and damage in lupus? **Presse Med**, v. 43: p. e151–e156, 2014.

FERNÁNDEZ, M. et al. A multiethnic, multicenter cohort of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) as a model for the study of ethnic disparities in SLE. **Arthritis Rheum**, v. 57, p. 576–584, 2007.

FERNANDEZ-GUTIERREZ, B. et al. Defective early T and T-dependent B cell activation in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 7, p. 314–322, 1998.

FLOYD-SMITH, G. et al. The human C-reactive protein gene (*CRP*) and serum amyloid P component gene (*APCS*) are located on the proximal long arm of chromosome 1. **Immunogenetics**, v. 24, p. 171–176, 1986.

FORTUNA, G.; BRENNAN, M.T. Systemic Lupus Erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. **Dent Clin North Am**, v. 57, p. 631–655, 2013.

FRIOU, G.J. Clinical application of a test for lupus globulin-nucleohistone interaction using fluorescent antibody. **Yale J Biol Med**, v. 31, p. 40–47, 1958.

GARCIA-COZAR, F.J. et al. Defective B7 expression on antigen-presenting cells underlying T cell activation abnormalities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. **Clin Exp Immunol**, v. 104, p. 72–79, 1996.

GATTO, M. et al. Emerging and critical issues in the pathogenesis of lupus. **Autoimmun Rev**, v. 12, p. 523–536, 2013.

GERSHOV, D. et al. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: Implications for systemic autoimmunity. **J Exp Med**, v. 192, p. 1353–1364, 2000.

GLADMAN, D.D.; IBÁÑEZ, D.; UROWITZ, M.B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J Rheumatol**, v. 29, p. 288-291, 2002.

GRAHAM, R.R. et al. Review of recent genome-wide association scans in lupus. **J Intern Med**, v. 265, p. 680–688, 2009.

GRONDAL, G. et al. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, v. 18, p. 565–570, 2000.

GROSS, A.J. et al. EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. **J Immunol**, v. 174, p. 6599–6607, 2005.

GUTIERREZ-ADRIANZEN, O.A. et al. Diagnostic value of antinucleosome antibodies in the assessment of disease activity of systemic lupus erythematosus: a prospective study comparing anti-nucleosome with anti-dsDNA antibodies. **J Rheumatol**, v. 33, p. 1538–1544, 2006.

HAGE, F.G.; SZALAI, A.J. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms, C-Reactive Protein Blood Levels, and Cardiovascular Disease Risk. **J Am Coll Cardiol**, v. 50, p. 1115-1122, 2007.

HAHN, B.H. Antibodies to DNA. **N Engl J Med**, v. 338, p. 1359–1368, 1998.

HARGRAVES, M.M.; RICHMOND, H.; MORTON, R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. **Proc Staff Meet Mayo Clin**, v. 23, p. 25–28, 1948.

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

HOLMES, C.L.; RUSSELL, J.A.; WALLEY, K.R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock-role in prognosis and potential for therapy. **Chest**, v. 124, p. 1103-1115, 2003.

HORWITZ, D.A.; GARRETT, M.A. Lymphocyte reactivity to mitogens in subjects with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and scleroderma. **Clin Exp Immunol**, v. 27, p. 92–99, 1977.

HOUSSIAU, F.A. et al. IL-12 inhibits in vitro immunoglobulin production by human lupus peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Clin Exp Immunol**, v. 108, p. 375–380, 1997.

JONSEN, A. et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and Fcγ3R genes. **Rheumatology**, v. 46, p. 1417-1421, 2007.

JORGE, S.G. **Porfirias Hepáticas**. 2011. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br>>. Acesso em: 10 de mar 2016.

KANDA, N.; TAMAKI, K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 103, p. 282–288, 1999.

KATHIRESAN, S. et al. Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. **Circulation**, v. 113, p. 1415–1423, 2006.

KELLY, J.A.; MOSER, K.L.; HARLEY, J.B. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. **Genes Immun**, v. 1, p. S71-S85, 2002.

KILPATRICK, J.M.; VOLANAKIS, J.E. Molecular genetics, structure, and function of C-reactive protein. **Immunol Res**, v. 10, p. 43-53, 1991.

KIM, H.A. et al. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms in Disease Susceptibility and Clinical Manifestations of Korean Systemic Lupus Erythematosus. **J Rheumatol**, v. 36, p. 2238-2243, 2009.

KLINMAN, D.M. et al. Quantitation of IgM- and IgG-secreting B cells in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 34, p. 1404–1410, 1991.

KOENE, H.R. et al. The Fc gammaRIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 41, p. 1813–1818, 1998.

KORB, L.C.; AHEARN, J.M. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. **J Immunol**, v. 158, p. 4525–4528, 1997.

KUHN, A.; WENZEL, J.; BIJL, M. Lupus erythematosus revisited. **Semin Immunopathol**, v. 38, p. 97-112, 2016.

KUSHNER, I.; RZEWNICKI, D.; SAMOLS, D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? **Am J Med**, v. 119, p. 166e17–28, 2006.

KYTTARIS, V.C. et al. New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Curr Rheumatol Rep**, v. 7, p. 469–475, 2005.

LAU, C.S.; YIN, G.; MOK, M.Y. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. **Lupus**, v. 15, p. 715–719, 2006.

LAUWERYS, B.R.; HOUSSIAU, F.A. Cytokines: clues to the pathogenesis of SLE. **Lupus**, v. 7, p. 211–213, 1998.

LAWRENCE, J.S.; MARTIN, C.L.; DRAKE, G.L. A family survey of lupus erythematosus. 1. Heritability. **J Rheumatol**, v. 14, p. 913–921, 1987.

LEDUE, T.B.; RIFAI, N. Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. **Clin Chem**, v. 49, p. 1258 –1271, 2003.

LEI, K.J. et al. Genomic DNA sequence for human C-reactive protein. **J Biol Chem**, v. 260, p. 13377–13383, 1985.

LINARES, L.F. et al. C-reactive protein (CRP) levels in systemic lupus erythematosus (SLE). **Clin Rheumatol**, v. 5, p. 66–69, 1986.

LINKER-ISRAELI, M.; QUISMORIO, F.P. JR.; HORWITZ, D.A. CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. **Arthritis Rheum**, v. 33, p. 1216–1225, 1990.

LLORENTE, L. et al. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. **Arthritis Rheum**, v. 37, p. 1647–1655, 1994.

- MACGREGOR, A.J. et al. Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid a protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. **Clin Chem**, v. 50, p. 130–134, 2004.
- MAMTANI, M. et al. CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 67, p. 1076-1083, 2008.
- MCCARTY, D.J. et al. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. **Arthritis Rheum**, v. 38, p. 1260–1270, 1995.
- MCMURRAY, R.W.; MAY, W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. **Arthritis Rheum**, v. 48, p. 2100–2110, 2003.
- MCMURRAY, R.W. et al. 17-beta-estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor. **Cytokine**, v. 14, p. 324–333, 2001.
- MCNALLY, J. et al. Fas ligand expression and function in systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, v. 159, p. 4628–4636, 1997.
- MEHRAN, R. et al. Synergistic effect between *IL-10* and *bcl-2* genotypes in determining susceptibility to SLE. **Arthritis Rheum**, v. 41, p. 596–602, 1998.
- MOHAN, C. et al. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. **J Exp Med**, v. 177, p. 1367–1381, 1993.
- MOK, C.C.; LAU, C.S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **J Clin Pathol**, v. 56, p. 481–490, 2003.
- MOK, C.C. et al. Incidence and mortality of systemic lupus erythematosus in a southern Chinese population, 2000-2006. **J Rheumatol**, v. 35, p. 1978–1982, 2008.
- MOLD, C.; GEWURZ, H.; DU CLOS, T.W. Regulation of complement activation by C-reactive protein. **Immunopharmacology**, v. 42, p. 23-30, 1999.
- MORROW, W.J. et al. C-reactive protein in sera from patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**, v. 8, p. 599–604, 1981.
- MOSER, K.L. et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 14869–14874, 1998.
- MOSER, K.L. et al. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Genes Immun**, v. 10, p. 373–379, 2009.
- MUNOZ, L.E. et al. SLE-a disease of clearance deficiency? **Rheumatology**, v. 44, p. 1101–1107, 2005.
- NAKASHIMA, C.A. et al. Incidence and clinical laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. **Rev Bras Rheumatol**, v. 51, p. 231–239, 2011.
- OATES, J.C.; GILKESON, G.S. Mediators of injury in lupus nephritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 14, p. 498–503, 2002.
- PANKOW, J.S. et al. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. **Atherosclerosis**, v. 154, p. 681–689, 2001.

PEPYS, M.B.; LANHAM, J.G.; DE BEER, F.C. C-reactive protein in SLE. **Clin Rheum Dis**, v. 8, p. 91–103, 1982.

PEPYS, M.B.; HIRSCHFIELD, G.M. C-reactive protein: a critical update. **J Clin Invest**, v. 111, p. 1805-1812, 2003.

PETRI, M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 64, p. 2677-2686, 2012.

PISETSKY, D.S. Anti-DNA and autoantibodies. **Curr Opin Rheumatol**, v. 12, p. 364–368, 2000.

PISETSKY, D.S. Systemic lupus erythematosus. A. Epidemiology, pathology and pathogenesis. In: KLIPPEL, J.H. **Primer on the rheumatic diseases**, 11th ed. Georgia, USA: Arthritis Foundation, 1997. p. 246–251.

PONS-ESTEL, B.A. et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among “Hispanics”. **Medicine**, v. 83, p. 1–17, 2004.

REICHLIN, M.; HARLEY, J.B.; LOCKSHIN, M.D. Serologic studies of monozygotic twins with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 35, p. 457-464, 1992.

REKVIG, O.P. et al. Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders? **Autoimmun Rev**, v. 11, p. 596–603, 2012.

RELLO, J.; RESTREPO, M.I. **Sepsis. New strategies for Management**. Berlin: Springer-Verlag, 2008.

RETTSTOL, L.; EIKVAR, L.; BERG, K. A twin study of C-Reactive Protein compared to other risk factors for coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 169, p. 279–282, 2003.

RHODES, B. et al. A genetic association study of serum acute-phase C-reactive protein levels in Rheumatoid Arthritis: implications for clinical interpretation. **PLoS Med**, v. 7, p. e1000341, 2010.

RHODES, B.; VYSE, T.J. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. **Rheumatology**, v. 47, p. 1603–1611, 2008.

ROBEY, F.A. et al. Binding of c-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of c-reactive protein. **J Biol Chem**, v. 259, p. 7311–7316, 1984.

ROOD, M.J. et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 43, p. 129-134, 2000.

ROY, S.; TAN, K.T. Pyrexia and normal c-reactive protein (crp) in patients with systemic lupus erythematosus: Always consider the possibility of infection in febrile patients with systemic lupus erythematosus regardless of CRP levels. **Rheumatology**, v. 40, p. 349–350, 2001.

RUSSELL, A.I. et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. **Hum Mol Genet**, v. 13, p. 137-147, 2004.

- SALMON, J.E. et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. **J Clin Invest**, v. 97, p. 1348–1354, 1996.
- SCHAUREN, J.S. et al. CCR5delta32 in systemic lupus erythematosus: implications for disease susceptibility and outcome in a Brazilian population. **Lupus**, v. 22, 2013.
- SCHUR, P.H. Genetics of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 4, p. 425–437, 1995.
- SESTAK, A.L. et al. Current status of lupus genetics. **Arthritis Res Ther**, v. 9, p. 210 (doi:10.1186/ar2176), 2007.
- SHAI, R. et al. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. **Hum Mol Genet**, v. 8, p. 639–644, 1999.
- SHIH, P.B. et al. Genetic variation in C-reactive protein (*CRP*) gene may be associated with risk of systemic lupus erythematosus and CRP concentrations. **J Rheumatol**, v. 35, p. 2171–2178, 2008.
- SHRIVE, A.K. et al. Three dimensional structure of human C-reactive protein. **Nat Struct Biol**, v. 3, p. 346–354, 1996.
- SILVA, C. et al. Protocolo de Avaliação e Monitorização do Lúpus Eritematoso Sistêmico (PAMLES). **Acta Reumatol Port**, v. 33, p. 210-218, 2008.
- STHOEGER, Z.M.; CHIORAZZI, N.; LAHITA, R.G. Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. **J Immunol**, v. 141, p. 91–98, 1988.
- SUÁREZ, A. et al. Differential effect of IL10 and TNF $\alpha$  genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 64, p. 1605–1610, 2005.
- SUZUKI, N. et al. Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 41, p. 344–353, 1998.
- SZALAI, A.J. C-reactive protein (crp) and autoimmune disease: Facts and conjectures. **Clin Dev Immunol**, v. 11, p. 221–226, 2004.
- TAN, E.M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 25, p. 1271–1277, 1982.
- TAN, E.M.; KUNKEL, H.G. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, v. 96, p. 464–471, 1966.
- THALMAIER, D. et al. The +1059G/C polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene is associated with involvement of the terminal ileum and decreased serum CRP levels in patients with Crohn's disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, p. 1105–1115, 2006.
- TILLET, W.; FRANCIS, T. Serological reactions in pneumonia with nonprotein somatic fraction of pneumococcus. **J Exp Med**, v. 52, p. 561–571, 1930.

TYRRELL-PRICE, J.; LYDYARD, P.M.; ISENBERG, D.A. The effect of interleukin-10 and of interleukin-12 on the in vitro production of anti-double-stranded DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Immunol**, v. 124, p. 118–125, 2001.

URAMOTO, K.M. et al. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950–1992. **Arthritis Rheum**, v. 42, p. 46–50, 1999.

VILAR, M.J.; SATO, E.I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v. 11, p. 528–532, 2002.

VILLAMIN, C.A.; NAVARRA, S.V. Clinical manifestations and clinical syndromes of Filipino patients with systemic lupus erythematosus. **Mod Rheumatol**, v. 18, p. 161–164, 2008.

VLAHAKOS, D. et al. Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. **J Am Soc Nephrol**, v. 2, p. 1345–1354, 1992.

VOLANAKIS, J.E.; WIRTZ, K.W. Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. **Nature**, v. 281, p. 155–157, 1979.

VOLANAKIS, J.E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. **Mol Immunol**, v. 38, p. 189–197, 2001.

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

WALPORT, M.J.; DAVIES, K.A.; BOTTO, M. C1q and systemic lupus erythematosus. **Immunobiology**, v. 199, p. 265–285, 1998.

WALSH, M.T.; DIVANE, A.; WHITEHEAD, A.S. Fine mapping of the human pentraxin gene region on chromosome 1q23. **Immunogenetics**, v. 44, p. 62–69, 1996.

WARRINGTON, R.J. Interleukin-2 abnormalities in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. A role for overproduction of interleukin-2 in human autoimmunity? **J Rheumatol**, v. 15, p. 616–620, 1988.

WATERER, G.W.; WUNDERINK, R.G. Science review: Genetic variability in the systematic inflammatory response. **Crit Care**, v. 7, p. 308–314, 2003.

WEINHOLD, B.; RUTHER, U. Interleukin-6-dependent and –independent regulation of the human C-reactive protein gene. **Biochem J**, v. 327, p. 425–429, 1997.

WOO, P.; KORENBERG, J.R.; WHITEHEAD, A.S. Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component. **J Biol Chem**, v. 260, p. 13384–13388, 1985.

YAN, M. et al. The relationship between gene polymorphism and CRP level in a Chinese Han population. **Biochem Genet**, v. 45, p. 1–9, 2007.

ZEE, R.Y.; RIDKER, P.M. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. **Atherosclerosis**, v. 162, p. 217–219, 2002.

ZOUKI, C. et al. Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. **J Clin Invest**, v. 100, p. 522-529, 1997.

## 8 ANEXOS E APÊNDICES

### 8.1 Anexo 1 - SLEDAI

#### SLE Daily Activity Index: Data Collection Sheet

SLEDAI Score	Descriptor	Definition
8	Seizures	Recent onset. Exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes.
8	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features. Include clouding of consciousness with reduced capacity to focus, and inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infection or drug causes.
8	Visual disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid or optic neuritis. Exclude hypertension, infection or drug causes.
8	Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	Lupus headache	Severe, persistent headache: may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
8	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infraction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	Arthritis	More than 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling or effusion).
4	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4	Urinary casts	Heme-granular or red blood cell casts.
4	Hematuria	>5 red blood cells high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	Proteinuria	>0.5 gm/24 hours. New onset or recent increase of more than 0.5 gm/24 hours.
4	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	New rash	New onset or recurrence of inflammatory type rash.
2	Alopecia	New onset or recurrence of abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	Mucosal ulcers	New onset or recurrence of oral or nasal ulcerations.
2	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2	Low complement	Decrease in CH50, C3 or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory.
2	Increased DNA binding	>25% binding by Farr assay or above normal range for testing laboratory.
1	Fever	>38°C. Exclude infectious cause.
1	Thrombocytopenia	<100,000 platelets/mm <sup>3</sup> .
1	Leukopenia	<3,000 white blood cells/mm <sup>3</sup> . Exclude drug causes.

TOTAL SLEDAI SCORE: \_\_\_\_\_

Fonte: Bombardier et al. (1992).

## 8.2 Anexo 2 – SLEDAI-2K

**Appendix 1.** SLEDAI-2K data collection sheet. (Check weight in SLEDAI-2K score column if descriptor is present at the time of the visit or in the preceding 10 days.)

Weight (check)	Descriptor	Definition
8 <input type="checkbox"/>	Seizure	Recent onset, exclude metabolic, infectious, or drug causes.
8 <input type="checkbox"/>	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes.
8 <input type="checkbox"/>	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features, inability to sustain attention to environment, plus at least two of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious, or drug causes.
8 <input type="checkbox"/>	Visual disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serous exudates or hemorrhages in the choroids, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
8 <input type="checkbox"/>	Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8 <input type="checkbox"/>	Lupus headache	Severe, persistent headache; may be migrainous but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8 <input type="checkbox"/>	Cerebrovascular accident	New onset of cerebrovascular accident(s); exclude arteriosclerosis.
8 <input type="checkbox"/>	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4 <input type="checkbox"/>	Arthritis	Two or more joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling, or effusion).
4 <input type="checkbox"/>	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4 <input type="checkbox"/>	Urinary casts	Heme granular or red blood cell casts.
4 <input type="checkbox"/>	Hematuria	More than five red blood cells/high power field; exclude stone, infection, or other cause.
4 <input type="checkbox"/>	Proteinuria	> 0.5 g/24 hr.
4 <input type="checkbox"/>	Pyuria	More than five white blood cells/high power field; exclude infection.
2 <input type="checkbox"/>	Rash	Inflammatory type rash.
2 <input type="checkbox"/>	Alopecia	Abnormal, patchy, or diffuse loss of hair.
2 <input type="checkbox"/>	Mucosal ulcers	Oral or nasal ulcerations.
2 <input type="checkbox"/>	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion or pleural thickening.
2 <input type="checkbox"/>	Pericarditis	Pericardial pain with at least one of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2 <input type="checkbox"/>	Low complement	Decrease in the complement proteins C3 and C4 or in total complement activity (CH50), below the lower limit of normal for testing laboratory.
2 <input type="checkbox"/>	Increased DNA binding	Increased DNA binding by Farr assay above normal range for testing laboratory.
1 <input type="checkbox"/>	Fever	> 38°C; exclude infectious cause.
1 <input type="checkbox"/>	Thrombocytopenia	< 100,000 platelets/ $\times 10^9/L$ ; exclude drug causes.
1 <input type="checkbox"/>	Leukopenia	< 3,000 white blood cells/ $\times 10^9/L$ ; exclude drug causes.
Total score		

Fonte: Gladman et al. (2002).

**8.3 Anexo 3 – Parecer do CEP/UEL**

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



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

**Pesquisador:** Andréa Name Colado Simão

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 01865212.0.0000.5231

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 210.328

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

**Apresentação do Projeto:**

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

**Objetivo da Pesquisa:**

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

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

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

**Endereço:** AVENIDA ROBERT KOCH, 60

**Bairro:** VILA OPERÁRIA

**UF:** PR

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

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.038-440

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

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

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

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

Todas as pendências foram respondidas adequadamente.

**Recomendações:**

Encaminhar relatório ao final do estudo.

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

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezada Pesquisadora,

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

**Endereço:** AVENIDA ROBERT KOCH, 60

**Bairro:** VILA OPERÁRIA

**CEP:** 86.038-440

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

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

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

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



LONDRINA, 04 de Março de 2013

---

**Assinador por:**

**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli  
(Coordenador)**

**Endereço:** AVENIDA ROBERT KOCH, 60

**Bairro:** VILA OPERÁRIA

**UF:** PR

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

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.038-440

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

#### 8.4 Apêndice 1 – TCLE Para o Grupo de Pacientes

##### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo de pacientes)

###### Titulo da pesquisa:

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

Prezado(a) Senhor(a):

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

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

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

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

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

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

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

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

**RG: 6226736-4**

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

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

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

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

## 8.5 Apêndice 2 – TCLE Para o Grupo de Controles

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo controle)

### **Título da pesquisa:**

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

Prezado(a) Senhor(a):

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

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

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

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

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

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

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

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

**Pesquisador Responsável**

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

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

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

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

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

## 8.6 Apêndice 3 - Questionário para o Grupo de Controles

*Questionário Controles*

<i>Dados demográficos</i>		Nº do Controle:	
Nome			
Endereço			
Telefone			
Data de nascimento			
Faz uso de algum Medicamento?	Quais? Qual dosagem?		
Tem alguma Doença?			
Etnia	( ) Caucasiano ( ) Negro ( ) Mulato ( ) Asiático		
Cor da pele	( ) Branca ( ) Negra ( ) Pardo ( ) Amarela		
Exposição solar diária	( ) Não se expõe ao sol diariamente ( ) Baixa exposição ( ≤ 20 min/dia ) ( ) Exposição solar adequada (> 20 min/dia)		
Usa protetor solar?	( ) Sim ( ) Não Qual a frequência?		
Tabagismo	( ) Sim ( ) Não		
Consumo de álcool	( ) Sim ( ) Não		
Profissão			
Hábitos de dieta	( ) Suplementação alimentar ( ) Antioxidante ( ) Vitaminas ( ) Dieta específica		
	Obs.:		
<i>Dados Clínicos</i>			
IMC:	Peso:	Altura:	Circunferência:
Pressão Arterial:	Atividade física?	( ) Sim ( ) Não Quantas vezes?	
Teve Inflamação/ Infecção na última semana?	( ) Sim ( ) Não	Qual?	
Pós Menopausa	( ) Sim ( ) Não	Data última menstruação:	

## 8.7 Apêndice 4 - Questionário para o Grupo de Pacientes

## FICHA DE AVALIAÇÃO - PROJETO LES

NOME:		PRONTUÁRIO:		
DATA NASC:		CAUCASIANO ( ) NAO CAUC ( )		
END:		TEL:		
<p>MEDICAMENTOS</p> <p>PREDNISONA:  HIDROXICLOROQUINA/CLOROQUINA:  METOTREXATE:  AZATIOPRINA:  MICOFENOLATO MOFETIL:  OUTROS IMUNOSSUPRESSORES:  OUTROS:</p>				
<p>OUTRAS DOENÇAS:</p> <p>HAS SIM ( ) NÃO ( )  DIABETES SIM ( ) NÃO ( )  AVC/IAM SIM ( ) NÃO ( )  OUTROS:</p>				
<p>NEFRITE LÚPICA</p> <p>SIM ( ) NÃO ( )  OBS:</p>				
TEMPO DE DOENÇA:				
ESCORE SLEDAI:				
TABAGISMO: SIM ( ) NÃO ( )				
ATIVIDADE FÍSICA: SIM ( ) NÃO ( )				
PESO	ALTURA	IMC	CIRC. ABDOMINAL	PRESSÃO ARTERIAL