



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NICOLE PERUGINI STADTLOBER

**ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DO *FOXP3*
(rs2232365/rs3761548) E DO *TGFB1* (rs1800470/rs1800469)
COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DO
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Londrina
2020

NICOLE PERUGINI STADTLOBER

**ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DO *FOXP3*
(rs2232365/rs3761548) E DO *TGFB1* (rs1800470/rs1800469)
COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DO
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina
2020

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

| | |
|------|--|
| S777 | <p>Stadtlober, Nicole Perugini. ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DO FOXP3 (rs2232365/rs3761548) E DO TGFB1 (rs1800470/rs1800469) COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO / Nicole Perugini Stadtlober. - Londrina, 2020. 118 f. : il.</p> <p>Orientador: Andréa Name Colado Simão. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Lúpus - Tese. 2. Variantes genéticas - Tese. 3. Citocinas - Tese. 4. Autoanticorpos - Tese. I. Name Colado Simão, Andréa . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 61</p> |
|------|--|

NICOLE PERUGINI STADTLOBER

**ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS DO *FOXP3*
(rs2232365/rs3761548) E DO *TGFB1* (rs1800470/rs1800469)
COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DO
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão -
Orientadora
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Neide Tomimura Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Tamires Flauzino
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

À Deus, por abençoar e guiar os meus caminhos.

Aos meus pais e irmã, pelos ensinamentos, valores e princípios. E em especial, ao meu marido por todo amor, companheirismo e paciência.

À minha orientadora Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão, a quem tenho enorme respeito, carinho e admiração. Agradeço imensamente pela oportunidade de trabalharmos juntas, por toda a sua dedicação, pelos anos de convívio, aprendizado e amizade.

À Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, por compartilhar seus conhecimentos com tanto amor e carinho. Agradeço sua amizade e valiosas contribuições para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Marla Karine Amarante, por sua atenção e dedicação nas correções e sugestões deste trabalho.

À Profa. Dra. Neide Tomimura Costa, por toda contribuição ao longo desses anos de pesquisa e por ter me ensinado tanto no período que estive acompanhando o ambulatório.

Ao demais professores que integram nosso grupo de pesquisa, agradeço pelo compartilhamento de ideias e experiências.

Aos funcionários do laboratório de Imunologia, que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório, pela amizade e convívio diário.

Aos pacientes que participaram deste estudo, pela disposição e colaboração.

À Universidade Estadual de Londrina, e ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, que possibilitaram meu crescimento pessoal e profissional.

E principalmente às minhas grandes amigas Dra. Tamires Flauzino e Dra. Lorena Flor da Rosa Franchi Santos, que tiveram participação fundamental na realização e conclusão deste trabalho.

STADTLOBER, Nicole Perugini. **Associação das variantes genéticas do *FOXP3* (rs2232365/rs3761548) e do *TGFB1* (rs1800470/rs1800469) com parâmetros clínicos e laboratoriais do lúpus eritematoso sistêmico.** 2020.117f. Doutorado em Patologia Experimental – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Introdução: O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica, caracterizada por alterações na resposta imune inata e adaptativa. Variantes genéticas têm demonstrado alterar as respostas imunes e influenciar na suscetibilidade e gravidade da doença. **Objetivo:** Avaliar a associação das variantes genéticas -924 A>G (rs2232365) e -3279 C>A (rs3761548) do *FOXP3* e +869 T>C (rs1800470) e -509 C>T (rs1800469) do *TGFB1*, com a suscetibilidade e parâmetros clínicos e laboratoriais do LES. **Métodos e sujeitos:** O estudo incluiu 203 pacientes com LES e 166 controles. A atividade da doença foi determinada pelo índice de atividade da doença do LES (SLEDAI) e valores ≥ 6 foram usados como parâmetro para classificar doença ativa e <6 para doença inativa. As variantes do *FOXP3* foram determinadas pela reação em cadeia da polimerase e polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e as variantes do *TGFB1* por PCR qualitativa (qPCR). Os níveis plasmáticos de TGF- β 1 foram determinados pelo ensaio imunofluorimétrico por microesferas para a plataforma Luminex. **Resultados:** Foram demonstrados em dois artigos: no primeiro, o genótipo *FOXP3* -3279 AA [OR 2,650, IC 95% (1,070–6,564), $p=0,035$] e o alelo A [OR 2,644, IC 95% (1,104–6,333), $p=0,029$] foram associados ao LES. Pacientes com o genótipo *FOXP3* -3279 CA+AA apresentaram menor frequência de nefrite ($p=0,038$). E pacientes com o genótipo *FOXP3* -924 AA apresentaram maior frequência de anti-dsDNA ($p=0,012$) e anti-U1RNP ($p=0,036$). O haplótipo A/A (rs2232365/rs3761548) foi associado ao LES (OR 3,729, IC 95% 1,006–13,820, $p=0,049$) enquanto que o haplótipo G/C conferiu proteção [OR 0,598, IC 95% (0.376–0.952), $p=0,030$]. Pacientes com haplótipo GCGC apresentaram níveis plasmáticos de TGF- β 1 mais elevados ($p=0,012$) do que pacientes com outros haplótipos. E pacientes com haplótipo A/C (no modelo genético dominante) apresentaram maior score SLEDAI ($p=0,024$) e no modelo genético recessivo, maior frequência de anti-dsDNA ($p=0,038$), anti-U1RNP ($p=0,029$) e nefrite ($p=0,049$). No segundo artigo, o genótipo *TGFB1* +869 CC foi associado à suscetibilidade ao LES [OR 1,710, IC 95% (1,020-2,866), $p=0,042$] e à redução dos níveis plasmáticos de C4 ($p=0,040$) e TGF- β 1 ($p=0,044$). O genótipo *TGFB1* -509 TT foi associado a níveis diminuídos de C4 ($p=0,032$). Pacientes com genótipo *TGFB1* +869 TC+CC e presença de anti-dsDNA apresentaram níveis plasmáticos de TGF- β 1 mais baixos do que TT ($p=0,004$). Por outro lado, pacientes com genótipo *TGFB1* +869 TC+CC e ausência de anti-dsDNA apresentaram níveis plasmáticos de TGF- β 1 mais elevados ($p=0,044$). **Conclusão:** Do *FOXP3* os resultados demonstraram que a herança de pelo menos um alelo A de cada variante (rs2232365/rs3761548) aumenta à suscetibilidade ao LES, atividade da doença e presença de nefrite; e a variante *TGFB1* +869 T>C pode ser utilizada como um marcador genético para suscetibilidade ao LES, enquanto que ambas as variantes estão associadas com menores níveis de C4, um dos parâmetros laboratoriais de atividade da doença. Além disso, os níveis

plasmáticos de TGF- β 1 podem ser modulados pela interação entre o alelo *TGFB1* +869 C, em homozigose ou heterozigose, e a presença de anti-dsDNA. Nosso estudo demonstra que a investigação das bases genéticas nas doenças autoimunes pode favorecer o entendimento da imunologia no processo fisiopatológico e sugerir novos rumos na pesquisa terapêutica.

Palavras-chaves: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Suscetibilidade. SLEDAI. *FOXP3*. Fator transformador de crescimento beta 1. rs2232365. rs3761548. rs1800470. rs1800469.

STADTLOBER, Nicole Perugini. **Association of *FOXP3* (rs2232365 / rs3761548) and *TGFB1* (rs1800470 / rs1800469) genetic variants with clinical and laboratory parameters of Systemic Lupus Erythematosus.** 2020.117f. PhD in Experimental Pathology - Center for Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory autoimmune disease, characterized by changes in the innate and adaptive immune response. Genetic variants have been shown to alter immune responses and influence the susceptibility and severity of the disease. **Objective:** To evaluate the association of -924 A>G (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) *FOXP3* variants and +869 T>C (rs1800470) and -509 C>T (rs1800469) *TGFB1* variants, with susceptibility and clinical and laboratory parameters of SLE. **Methods and subjects:** The study included 203 SLE patients and 166 controls. Disease activity was determined by the SLE disease activity index (SLEDAI) and values ≥ 6 were used as a parameter to classify active disease and <6 for inactive disease. The *FOXP3* variants were determined by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and the *TGFB1* variants by real-time polymerase chain reaction (qPCR). TGF- β 1 plasma levels were determined by the microspheres immunofluorimetric assay for the Luminex platform. **Results:** Were demonstrated in two papers. In the first paper, the genotype *FOXP3* -3279 AA [OR 2.650, 95% CI (1.070–6.564), $p=0.035$], and the A allele [OR 2.644, 95% CI (1.104–6.333), $p=0.029$] were associated to LES. Patients with the *FOXP3* -3279 CA+AA genotype had a lower frequency of nephritis ($p=0.038$). Patients with the *FOXP3* -924 AA genotype had a higher frequency of anti-dsDNA ($p=0.012$) and anti-U1RNP ($p=0.036$). The A/A haplotype (rs2232365/rs3761548) was associated with SLE (OR 3.729, 95% CI 1.006–13.820, $p=0.049$) while the G/C haplotype conferred protection [OR 0.598, 95% CI (0.376–0.952), $p=0.030$]. Patients with haplotype GCGC had higher TGF- β 1 levels ($p=0.012$) than those with other haplotypes. Patients with A/C haplotype (in dominant genetic model) had a higher SLEDAI score ($p = 0.024$) and in the recessive genetic model a higher frequency of anti-dsDNA ($p=0.038$), anti-U1RNP ($p=0.029$) and nephritis ($p=0.049$). In the second paper, the *TGFB1* +869 CC genotype was associated with SLE susceptibility [OR 1.710, 95% CI (1.020–2.866), $p=0.042$] and a lower levels of C4 ($p=0.040$) and TGF- β 1 ($p=0.044$). The *TGFB1* -509 TT genotype was associated with decreased levels of C4 ($p=0.032$). Patients with the *TGFB1* +869 TC+CC genotype and the presence of anti-dsDNA had plasma TGF- β 1 levels lower than TT ($p=0.004$). On the other hand, patients with the *TGFB1* +869 TC+CC genotype and absence of anti-dsDNA had higher plasma levels of TGF- β 1 ($p=0.044$). **Conclusion:** In *FOXP3*, the results demonstrated that the inheritance of at least one A allele of each variant (rs2232365/rs3761548), increases SLE susceptibility, disease activity, and presence of nephritis; and the *TGFB1* +869 T>C variant can be used as a genetic marker for SLE susceptibility, while both variants are associated with reduced C4 levels, one of the laboratory parameters of disease activity. In addition, plasma levels of TGF- β 1 can be modulated by the interaction between the *TGFB1* +869 C allele, in homozygosis or heterozygosis, and the presence of anti-dsDNA. Our study demonstrates that the

investigation of genetic bases in autoimmune diseases can favor the understanding of immunology in the pathophysiological process and suggest new directions in therapeutic research.

Key-words: Systemic Lupus Erythematosus. Susceptibility. SLEDAI. *FOXP3*. Transforming growth factor beta 1. rs2232365. rs3761548. rs1800470. rs1800469.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico | 20 |
| Figura 2 – Mecanismos supressores de células T reguladoras..... | 23 |
| Figura 3 – Organização genômica e estrutural do <i>FOXP3</i> | 25 |
| Figura 4 – Estrutura genômica do <i>TGFB1</i> | 29 |
| Figura 5 – Perfil eletroforético em gel de acrilamida para caracterização dos genótipos do rs2232365 <i>FOXP3</i> -924 A>G | 39 |
| Figura 6 – Perfil eletroforético em gel de acrilamida para caracterização dos genótipos do rs3761548 <i>FOXP3</i> -3279 C>A..... | 40 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Sondas para genotipagem das variantes do <i>TGFB1</i> | 41 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------|--|
| AMPC | Monofosfato de adenosina cíclica |
| ANA | Anticorpos antinucleares |
| Anti-U1RNP | Anticorpo anti-U1 ribonucleoproteína |
| Anti-Sm | Anticorpo anti- Smith |
| Anti-SSA | Anticorpo contra o antígeno A relacionado à Síndrome de Sjogren |
| Anti-SSB | Anticorpo contra o antígeno B relacionado à Síndrome de Sjogren |
| APC | Célula apresentadora de antígenos |
| AR | Artrite reumatoide |
| AZA | Azatioprina |
| BAFF | Fator ativador de células B |
| Bcl 2 | Proteína 2 do linfoma de células B |
| BCR | Receptor de célula B |
| BILAG | Índice de atividade a doença avaliado pelo Grupo de Lúpus das Ilhas Britânicas |
| A | Adenina |
| ACR | <i>American College of Rheumatology</i> |
| APRIL | Ligante indutor de proliferação |
| AVC | Acidente vascular cerebral |
| C | Citosina |
| CD25 | Cadeia alfa do receptor da interleucina-2 |
| CR1 | Receptor do complemento 1 |
| CTLA-4 | Antígeno 4 de linfócito T citotóxico |
| CYC | Ciclofosfamida |
| DC | Doença de Crohn |
| DII | Doença inflamatória intestinal |
| dsDNA | DNA de fita dupla |

| | |
|---------------|---|
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetraacético |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| EM | Esclerose múltipla |
| ENAs | Anticorpo contra antígenos extraíveis do núcleo |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| EULAR | <i>European League against Rheumatism</i> |
| fDC | Célula dendrítica folicular |
| FC-R γ | Receptor Fc- γ |
| <i>FOXP3</i> | <i>Forkhead transcriptional fator 3</i> |
| G | Guanina |
| GC | Glicocorticoides |
| GZB | Granzima B |
| HLA | Antígeno leucocitário humano |
| HCQ | Hidroxicloroquina |
| IC | Intervalo de confiança |
| IFI | Imunofluorescência indireta |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleucina |
| IMC | Índice de massa corporal |
| iTreg | Células T reguladoras induzidas |
| kB | Kilobase |
| LES | Lúpus eritematoso sistêmico |
| LAG-3 | Gene 3 de ativação de linfócitos |
| mDC | Célula dendrítica mieloide |
| MGB | <i>Minor groove binder</i> |
| MHC | Complexo de histocompatibilidade |
| MMF | Micofenolato mofetil |

| | |
|--------------|--|
| MTX | Metotrexato |
| NET | Armadilha extracelular de neutrófilos |
| NL | Nefrite lúpica |
| nTreg | Células T reguladoras naturais |
| OR | <i>Odds ratio</i> |
| ox-mDNA | DNA mitocondrial oxidado |
| pb | pares de base |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pDC | Célula dendrítica plasmocitoide |
| PRF | Perforina |
| qPCR | Reação em cadeia da polimerase qualitativa |
| RCU | Retocolite ulcerativa |
| RFLP | Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição |
| RTX | Rituximabe |
| SLAM | Medida de atividade lúpica sistêmica |
| SLEDAI | Índice de atividade de doença do lúpus eritematoso sistêmico |
| SNV | <i>Single nucleotide variant</i> |
| STAT1 | Fator de transcrição |
| T | Timina |
| T-bet | Fator de transcrição T-box |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TCR | Receptor de células T |
| TLR | Receptor do tipo <i>toll</i> |
| TGF- β | Fator transformador de crescimento β |
| Th | Linfócito <i>T helper</i> |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| Treg | Células T reguladoras |

UEL Universidade Estadual de Londrina

UV Ultravioleta

XC Xileno cianol

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO | 14 |
| 1.2 | CÉLULAS T REGULADORAS | 21 |
| 1.3 | FATOR DE TRANSCRIÇÃO <i>FOXP3</i> E SUAS VARIANTES GENÉTICAS..... | 24 |
| 1.4 | VARIANTES GENÉTICAS DO <i>TGFB1</i> E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO..... | 28 |
| 1.5 | TRATAMENTO..... | 31 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 33 |
| 3 | OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 34 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 34 |
| 4 | SUJEITOS E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 | ASPECTOS ÉTICOS E CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 35 |
| 4.2 | DELINEAMENTO E POPULAÇÃO..... | 35 |
| 4.3 | COLETA, ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS..... | 36 |
| 4.4 | DETERMINAÇÃO DE MARCADORES LABORATORIAIS | 36 |
| 4.5 | VARIANTES GENÉTICAS | 37 |
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 41 |
| 5 | RESULTADOS | 43 |
| 5.1 | ARTIGO 1 | 44 |
| 5.2 | ARTIGO 2 | 70 |
| 6 | CONCLUSÃO | 93 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 95 |
| | REFERÊNCIAS | 95 |

| | |
|--|-----|
| APÊNDICES | 108 |
| APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 109 |
| APÊNDICE B – Ficha de Avaliação de Pacientes e Controles | 111 |
| | |
| ANEXOS | 112 |
| ANEXO A – Critérios de Classificação do LES (EULAR/ACR 2019)..... | 113 |
| ANEXO B – Score SLEDAI-2K..... | 114 |
| ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética..... | 115 |
| ANEXO D – Critérios de Classificação do LES (ACR/SLICC 2012) | 118 |

1 1 INTRODUÇÃO

2 1.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

3 O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica
4 caracterizada pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de complexos
5 imunes que ocasionam inflamação e dano tecidual (FELTEN et al., 2018; OATES,
6 2010). A disfunção orgânica presente no LES pode variar de leve a grave com amplo
7 espectro de manifestações clínicas que assumem um padrão de exacerbação
8 intercalado por períodos de remissão (GILES; BOACKLE, 2013; MOK, 2017).

9 O diagnóstico do LES é baseado nos novos critérios de classificação
10 desenvolvidos pela Liga Europeia Contra Reumatismo (EULAR, da sigla em inglês) e
11 o Colégio Americano de Reumatologia (ACR, da sigla em inglês) em 2019, que
12 constituem um sistema de pontos em que são atribuídos peso variável a cada um dos
13 22 critérios estabelecidos. Os critérios de classificação incluem anticorpos
14 antinucleares (ANA) positivo, pelo menos uma vez, como critério obrigatório de
15 entrada; seguido de critérios aditivos agrupados em sete domínios clínicos
16 (constitucionais, hematológicos, neuropsiquiátricos, mucocutâneos,
17 musculoesqueléticos, renais e comprometimento de serosas) e três imunológicos
18 (anticorpos antifosfolípidos, proteínas do sistema complemento e anticorpos
19 específicos para o LES) variando a pontuação de 2 a 10 pontos (Anexo A). O
20 diagnóstico do LES é determinado quando a soma dos critérios for ≥ 10 (ARINGER et
21 al., 2019).

22 As principais manifestações clínicas dos pacientes com LES estão relacionadas
23 ao processo inflamatório da doença que acomete, principalmente, pele e articulações
24 e, em casos mais graves, rins e sistema nervoso central (BORCHERS et al., 2010).
25 As manifestações musculoesqueléticas são frequentes e cerca de 88% dos pacientes
26 apresentam artrite com dor ao movimento, sensibilidade e edema (CECCARELLI et
27 al., 2017). As principais articulações envolvidas são as das mãos (82%), joelhos (76%)
28 e, de forma menos frequente, punhos, tornozelos, cotovelos e ombros (ROTHFIELD;
29 SONTHEIMER; BERNSTEIN, 2006).

30 O acometimento da pele está presente em, aproximadamente, 75% dos
31 pacientes e é considerado o segundo sintoma mais frequente perdendo somente para
32 o acometimento das articulações (OBERMOSER; SONTHEIMER; ZELGER, 2010).

1 Existem três principais categorias de doença de pele específicas do LES: lúpus
2 eritematoso cutâneo agudo, lúpus eritematoso cutâneo subagudo e lúpus eritematoso
3 cutâneo crônico (HEJAZI; WERTH, 2016). Essas categorias são determinadas de
4 acordo com os diferentes e específicos padrões clínicos e histológicos, observados
5 na doença (RIBERO et al., 2017).

6 O acometimento renal ocorre em 50% dos pacientes, sendo a nefrite lúpica (NL)
7 a mais frequente (ROTHFIELD; SONTHEIMER; BERNSTEIN, 2006), e está associada
8 a pior prognóstico, contribuindo substancialmente para a morbidade e mortalidade
9 (ISENBERG et al., 2010). O diagnóstico patológico é realizado por meio de biópsia
10 renal que pode revelar seis classes de NL: a classe I (NL mesangial mínima), classe
11 II (NL mesangial proliferativa), classe III (NL focal), classe IV (NL difusa), classe V (NL
12 membranosa) e classe VI (NL esclerótica avançada) (WEENING et al., 2004).

13 O curso clínico do LES pode ser avaliado por meio de índices de atividade que
14 foram criados com o objetivo de padronizar a avaliação do LES e determinar o grau
15 de acometimento e gravidade do paciente. Entre os índices mais utilizados estão a
16 Medida de Atividade Lúpica Sistêmica (SLAM), os critérios do Grupo de Avaliação de
17 Lúpus das Ilhas Britânicas (BILAG) e o Índice de Atividade da Doença Lúpus
18 Eritematoso Sistêmico (SLEDAI) (GLADMAN et al., 1992). O score SLEDAI-2K (Anexo
19 B) é constituído de 24 critérios, 16 relacionados aos parâmetros clínicos e 8 aos
20 parâmetros laboratoriais. A somatória dos pontos de cada um destes critérios resulta
21 em uma pontuação final que representa a atividade da doença e o estado do paciente.
22 A pontuação final pode variar de 0 a 105 pontos; quanto maior for a pontuação, maior
23 a atividade do LES (GLADMAN; IBANEZ; UROWITZ, 2002).

24 As taxas de incidência e prevalência do LES estão fortemente associadas a
25 fatores como sexo, idade e etnia (LI et al., 2018). Embora possa ocorrer em ambos os
26 sexos e em qualquer faixa etária, a maior incidência do LES ocorre no sexo feminino,
27 principalmente na faixa etária entre 16 e 55 anos, com razão de prevalência
28 feminino/masculino de 9:1 (LISNEVSKAIA; MURPHY; ISENBERG, 2014). Alguns
29 estudos têm demonstrado que os hormônios sexuais femininos apresentam papel
30 importante no desenvolvimento da doença, já que interagem com o sistema
31 imunológico, principalmente com células B e T, células dendríticas e diversas citocinas
32 inflamatórias (GRIMALDI et al., 2005; GRYGIEL-GÓRNIAK; PUSZCZEWICZ, 2014;
33 RENU; ISENBERG, 2012). Além disso, descendentes de Africanos, Asiáticos e
34 Hispânicos apresentam maior risco de desenvolvimento do LES do que indivíduos

1 Caucasianos e exibem períodos mais ativos da doença, manifestações clínicas mais
2 graves e altas taxas de mortalidade (FALASINNU et al., 2018).

3 O aumento na incidência de LES tem sido atribuído a ampliação das
4 alternativas de diagnóstico, maior variedade de testes imunológicos, uniformidade dos
5 critérios de classificação da doença e maior acesso ao sistema de saúde (BORCHERS
6 et al., 2010; CARTER; BARR; CLARKE, 2016). As taxas de incidência global da
7 doença variam de 0,3 a 23,7 casos para 100.000 habitantes/ano com prevalência
8 estimada de 6,5 a 178,0 casos para 100.000 habitantes. No Brasil, a prevalência de
9 LES é de aproximadamente 98 casos para 100.000 habitantes (CARTER; BARR;
10 CLARKE, 2016).

11 1.1.1 Etiologia e fisiopatologia do lúpus eritematoso sistêmico

12 Apesar dos dados disponíveis a respeito da ocorrência e das manifestações
13 clínicas da doença, a etiologia do LES não está completamente elucidada. Sabe-se
14 que ela é multifatorial e inclui fatores genéticos, ambientais e hormonais de modo que
15 a interação entre eles pode originar respostas imunes anormais e perda da tolerância
16 imunológica (BATU, 2018; LISNEVSKAIA; MURPHY; ISENBERG, 2014).

17 A predisposição genética é aceita como elemento chave na suscetibilidade à
18 doença. A concordância de LES em gêmeos idênticos, o aumento da frequência de
19 LES entre parentes de primeiro grau e o aumento do risco de desenvolvimento da
20 doença entre irmãos reflete uma herança poligênica da doença (PISETISKY, 1997).

21 A variante genética do antígeno leucocitário humano (HLA) classe II do tipo
22 HLA-DR2 e DR3 tem sido relacionada ao LES e à presença de autoanticorpos como,
23 anticorpo contra o antígeno A relacionado a Síndrome de Sjögren (anti-SSA/Ro),
24 anticorpo contra o antígeno B relacionado a Síndrome de Sjögren (anti-SSB/La),
25 anticorpo anti-U1 ribonucleoproteína (anti-U1RNP) e anticorpo contra DNA dupla fita
26 (anti-dsDNA) (GHODKE-PURANIK; NIEWOLD, 2015; MORRIS et al., 2014). As
27 variantes em genes não-HLA também têm sido associadas com LES e incluem genes
28 que codificam a proteína ligadora de manose, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)
29 e beta (TNF- β), o receptor de célula T (TCR), a interleucina (IL)-6, o receptor de
30 complemento 1 (CR1) e receptores da porção Fc da cadeia gama da imunoglobulina
31 G (FcRII γ e FcRIII γ) (AHMED et al., 2014; TERUEL; ALARCÓN-RIQUELME, 2016).

1 Além dos fatores genéticos, os hormônios sexuais femininos têm demonstrado
2 participação direta no desenvolvimento do LES, uma vez que a doença é mais
3 frequente em mulheres com pico de incidência na fase reprodutiva, entre a menarca
4 e a menopausa (LAHITA, 2016; STOHL, 2017). A excessiva atividade estrogênica
5 presente em mulheres geneticamente predispostas parece estar relacionada ao
6 aumento da produção de interferon (IFN) tipo 1, inibição da resposta celular T *helper*
7 (Th)-1 e aumento da produção de citocinas da resposta celular Th2, que promovem
8 aumento da sobrevivência de linfócitos B autorreativos e produção de autoanticorpos
9 (GRIMALDI et al., 2005; HUGHES; CHOUBEY, 2014).

10 O surgimento do LES também parece exigir a exposição a agentes ambientais
11 que podem desencadear ou acelerar o processo da doença (PARKS et al., 2017).
12 Fatores ambientais como a exposição à sílica, pesticidas e solventes, consumo de
13 álcool, tabagismo, radiação ultravioleta (UV) e agentes infecciosos, como o vírus
14 Epstein-Barr, aparecem como gatilho no desenvolvimento da doença em indivíduos
15 geneticamente suscetíveis (BARBHAIYA; COSTENBADER, 2014).

16 Apesar da fisiopatologia do LES não estar totalmente elucidada, os diversos
17 fatores etiológicos do LES desencadeiam as anormalidades imunes presentes na
18 doença, o que resulta na regulação debilitada de linfócitos B e T, no *clearance*
19 defeituoso de autoantígenos, na produção de autoanticorpos patogênicos e na
20 formação de complexos imunes (COLONNA; LOOD; ELKON, 2014; KUHN; WENZEL;
21 BIJL, 2016; MOULTON et al., 2018). Desta forma, o LES é caracterizado por disfunção
22 tanto da resposta imune inata como da adaptativa (TSOKOS et al., 2016).

23 O sistema complemento desempenha função essencial na fisiopatologia do
24 LES pela eliminação de restos apoptóticos, ativação de células B e T e opsonização
25 e depuração de complexos imunes (GHODKE-PURANIK; NIEWOLD, 2015). No
26 entanto, respostas inadequadas do sistema complemento podem conduzir ao
27 aumento do nível de morte celular e diminuição do *clearance* de células apoptóticas
28 e, conseqüentemente, provocar acúmulo de detritos celulares que funcionam como
29 imunógenos para células B (JEONG et al., 2018). Estes imunógenos podem ser
30 reconhecidos pelos receptores do tipo *Toll* (TLRs) (TLR3, TLR7 e TLR9), localizados
31 em endossomos ou na superfície de diversos tipos celulares, como células
32 apresentadoras de antígenos (APCs), células dendríticas e células B.

33 Os TLRs constituem uma família de proteínas de reconhecimento de patógenos
34 e têm como finalidade discriminar o próprio do não-próprio e estimular respostas

1 imunológicas contra agentes patológicos (AHMADPOOR et al., 2014). A exposição
2 prolongada a estes imunógenos conduz a perda da tolerância imunológica destas
3 células e a produção de autoanticorpos que, por sua vez, favorecem a formação e
4 deposição de complexos imunes (GHODKE-PURANIK; NIEWOLD, 2015; JEONG et
5 al., 2018).

6 Ao mesmo tempo em que os autoanticorpos são produzidos e os complexos
7 imunes formados, os linfócitos Th ou auxiliares CD4⁺ controlam e modificam as
8 respostas imunes pela secreção de uma variedade de citocinas. As citocinas
9 produzidas variam de acordo com os perfis de linfócitos Th, sendo os mais estudados
10 o Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg). O perfil Th1 é caracterizado
11 principalmente pela produção de citocinas como IL-2, IL-10, IFN- γ e TNF- α . As
12 citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25 fazem parte do perfil Th2. Já o perfil Th17
13 produz especialmente IL-17 e IL-22, enquanto as células Treg produzem citocinas
14 com atividade anti-inflamatórias como a IL-10 e o fator transformador do crescimento
15 β (TGF)- β (SU et al., 2012). O TGF- β é uma citocina que apresenta potente ação
16 imunorreguladora. Atua no controle da proliferação, sobrevivência e ativação de
17 células B, bem como no desenvolvimento de células *natural killer*, macrófagos e
18 células dendríticas (SANJABI; OH; LI, 2017). Da mesma forma que regula a seleção
19 de células T no timo, inibindo a diferenciação de linfócitos T citotóxicos, células Th1 e
20 Th2, promove a diferenciação de Treg e células Th17 (SCHOTTE et al., 2003).

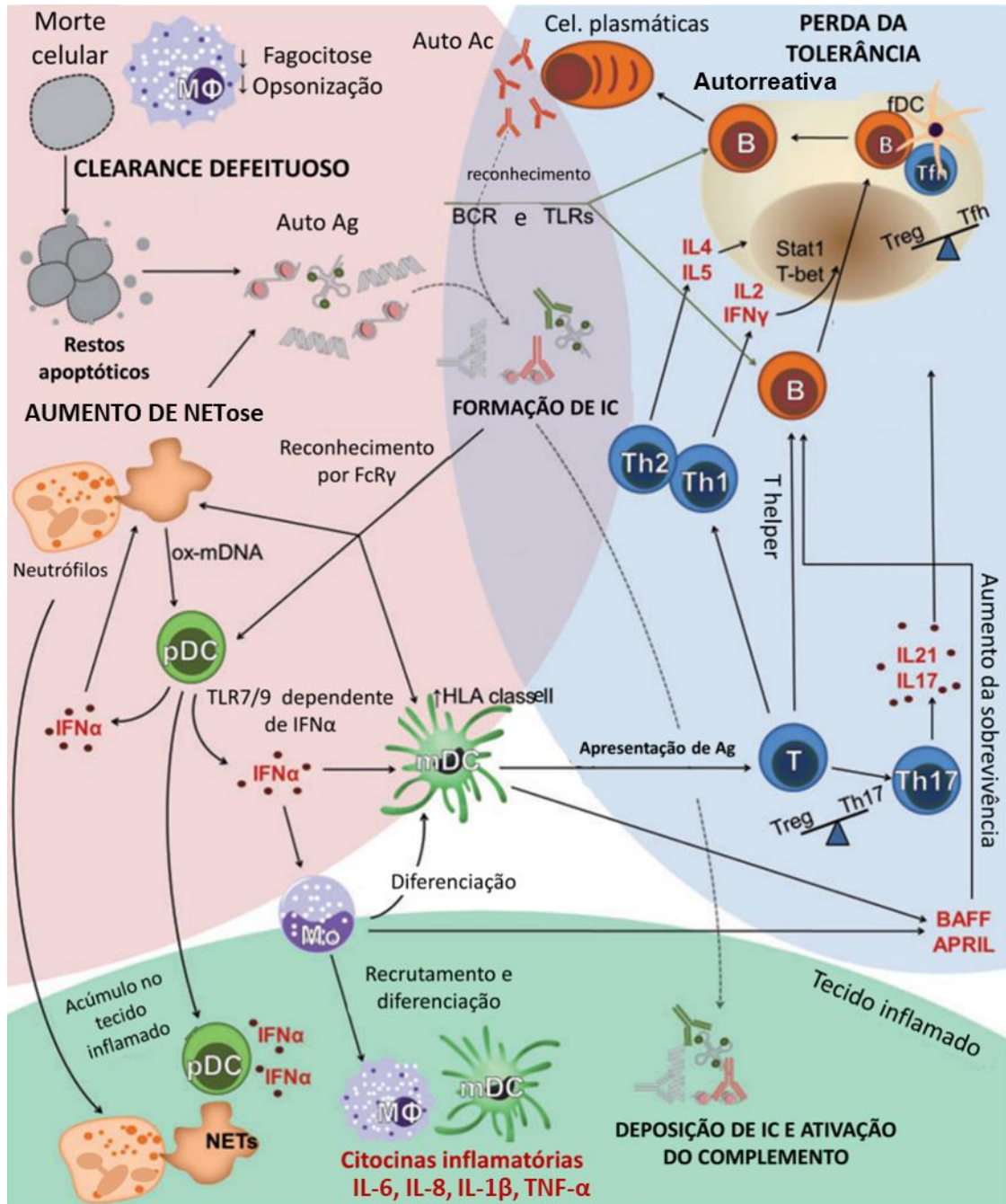
21 No LES, os linfócitos Th apresentam capacidade efetora e reguladora
22 comprometidas e são responsáveis pela produção exacerbada de citocinas
23 inflamatórias e reduzida ação imunorregulatória (COMTE; KARAMPETSOU;
24 TOSOKOS, 2015). Adicionalmente, células dendríticas mieloides, ativadas pelas
25 vesículas apoptóticas, aumentam a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-
26 1 β , IL-6 e TNF- α , aumentando ainda mais a resposta inflamatória no LES (BOUTS et
27 al., 2012; ZHARKOVA et al., 2017).

28 No decorrer da doença, múltiplos autoanticorpos podem ser produzidos. Eles
29 são direcionados, principalmente, contra estruturas nucleares como dsDNA, histonas,
30 nucleossomo e componentes da cromatina. Anti-dsDNA e anticorpos contra antígenos
31 extraíveis do núcleo (ENAS), entre eles anticorpos anti-U1RNP, anti-Smith (anti-SM),
32 anti-SSA/Ro e anti-SSB/La, são autoanticorpos característicos do LES (FU et al.,
33 2015). Os anticorpos anti-dsDNA contribuem para o diagnóstico e monitoramento da
34 atividade da doença (INFANTINO et al., 2018). O mecanismo patogênico dos

1 anticorpos anti-dsDNA inclui capacidade de deposição em tecidos e habilidade de
2 recrutar células inflamatórias que conduzem a lesão tecidual (GHEITA et al., 2018).
3 Já os anticorpos contra ENAS estão envolvidos nas manifestações clínicas do LES e
4 associados a lesões locais e sistêmicas, e podem afetar pele, articulações, rins,
5 pulmões, coração e sistema nervoso central (INFANTINO et al., 2018; MALKIEL et al.,
6 2018).

7 Os complexos imunes, formados pelos autoanticorpos ligados a antígenos
8 próprios, também podem ativar outro subtipo de células dendríticas, as células
9 dendríticas plasmocitoides, e iniciar uma resposta de IFN tipo I com produção de IFN-
10 α (ZHARKOVA et al., 2017). Os IFNs do tipo I desempenham papel relevante na
11 secreção de citocinas, apoptose celular, desenvolvimento de células imunes e
12 ativação e diferenciação celular (JENSEN; NIEWOLD, 2015). Desta forma, os IFNs do
13 tipo I também contribuem para o rompimento da autotolerância no LES ao
14 promoverem células dendríticas imaturas, suprimirem células Treg, aumentarem a
15 diferenciação para células Th17 e estimularem a proliferação de células B
16 (BENGTSSON; RONNBLOM, 2017). A figura 1 sumariza os principais mecanismos
17 imunológicos envolvidos na fisiopatologia do LES.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 **Figura 1** — Fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

Fonte: ZHARKOVA et al., (2017, p. i57, tradução nossa). A perda da tolerância imunológica (parte azul da figura) conduz a um aumento de células B autorreativas. Sinais de autoantígenos através de ligantes TLR, BAFF/APRIL e citocinas derivadas de células T promovem a produção de autoanticorpos. Os defeitos imunológicos inatos que levam ao aumento da disponibilidade de autoantígenos (parte rosa da figura) incluem o aumento da NETose, a depuração prejudicada de detritos apoptóticos e a fagocitose reduzida. Os autoantígenos formam complexos imunes com autoanticorpos, permitindo a captação mediada por FcR γ e a ativação de várias vias. Por fim, ocorre a inflamação e dano tecidual (parte verde da figura) causados por mediadores liberados por células inflamatórias

1 recrutadas e ativação do sistema complemento induzida por complexos imunes. Ac:
2 anticorpos; Ag: antígeno; APRIL: ligante indutor de proliferação; B: células B; BCR: receptor
3 de célula B; BAFF; fator de ativação de células B; FcR γ : receptor Fc- γ ; fDC: célula dendrítica
4 folicular; HLA classe II: antígeno leucocitário humano de classe II; IC: imunocomplexos; IFN γ :
5 interferon gama; IL: interleucinas; mDC: célula dendrítica mieloide; M ϕ : macrófago; Mo:
6 monócito; NET: armadilha extracelular de neutrófilos; ox-mDNA: DNA mitocondrial oxidado;
7 pDC: célula dendrítica plasmocitoide; Stat1: fator de transcrição; T: célula T; T-bet: fator de
8 transcrição T-box; TCR: receptor de célula T; Tfh: T *helper* folicular; TLR7/9: receptores *Toll-*
9 *like* 7 e 9.

10 1.2 CÉLULAS T REGULADORAS

11 As células Treg são uma população de células T CD4⁺ que expressam
12 constitutivamente a molécula cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25) e o fator de
13 transcrição FoxP3, e atuam na tolerância imunológica, sendo essenciais na
14 modulação da resposta imune contra patógenos, alérgenos, células tumorais e
15 antígenos próprios (SAKAGUCHI et al., 2008; TAO et al., 2017).

16 De acordo com sua origem e características biológicas, as Tregs podem ser
17 divididas em dois subgrupos: células T reguladoras naturais (nTreg) e células T
18 reguladoras induzidas (iTreg). As nTregs surgem no timo durante a maturação de
19 células T a partir do reconhecimento de antígenos próprios por meio do TCR e CD28
20 de células dendríticas. Enquanto as iTregs, são derivadas de células T CD4⁺ *naïves*
21 em tecidos linfoides periféricos, sob certos estímulos antigênicos ou na presença de
22 citocinas como TGF- β e IL-2 (SAKAGUCHI et al., 2008).

23 Do ponto de vista funcional, a ação imunorreguladora de células Treg ocorre
24 por meio de uma variedade de mecanismos efetores (SCHEFFOLD; MURPHY;
25 HÖFER, 2007). Formula-se que existam, pelo menos, quatro mecanismos de
26 supressão destas células: contato célula-célula, liberação de citocinas inibitórias,
27 competição por fatores de crescimento e produção de granzimas (Figura 2)
28 (CRETNEY; KALLIES; NUTT, 2013; DARIO A. A. VIGNALI, 2008).

29 O contato célula-célula é baseado na interação de células Treg com células T
30 CD4⁺ efetora e requer a participação de moléculas de superfície, como o antígeno 4
31 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e o gene 3 de ativação de linfócitos (LAG-3) (CAO et
32 al., 2007; JANSSENS et al., 2003). A molécula CTLA-4 se liga ao receptor de
33 membrana CD80 expresso em células dendríticas e células T ativadas, e libera sinais

1 inibitórios que suprimem células T efectoras e células T *naïve* (SCHEFFOLD;
2 MURPHY; HÖFER, 2007). Outro mediador envolvido é o monofosfato de adenosina
3 cíclica (AMPc), liberado por células Treg, que em níveis elevados, inibem a
4 proliferação e diferenciação celular e a expressão de citocinas como IL-2 e IFN- γ
5 (SOJKA; HUANG; FOWELL, 2008).

6 O mecanismo de produção de citocinas envolve a liberação IL-10 e TGF- β que
7 atuam na supressão de células-alvo, na modulação da expressão de FoxP3 em
8 células Treg, na inibição de APCs e na ação antagonista ao IFN- γ (SCHEFFOLD;
9 MURPHY; HÖFER, 2007).

10 O terceiro mecanismo ocorre pela competição por fatores de crescimento,
11 especialmente a IL-2, entre células Treg e células-alvo (SOJKA; HUANG; FOWELL,
12 2008). As células Treg, por expressarem a molécula CD25, apresentam uma
13 vantagem competitiva inicial para o consumo de IL-2. E dessa forma, desencadeiam
14 nas células-alvo a morte por apoptose induzida por privação de IL-2, através da
15 proteína do linfoma 2 de células B (Bcl-2)/via BIM (PANDIYAN et al., 2007).

16 Por fim, a liberação de granzima B (GZB) e perforina (PRF) que atuam
17 especificamente em precursores mieloides, por meio de atividade citolítica (PEREIRA
18 et al., 2017). A atividade citolítica em células-alvo, induz a apoptose por meio de
19 caspases ou através da via BID. Dessa forma, a capacidade de controlar as respostas
20 imunológicas faz com que as células Treg desempenhem papéis centrais na
21 prevenção de doenças autoimunes, inflamatórias e alérgicas (SAKAGUCHI et al.,
22 2010).

23

24

25

26

27

28

29

30

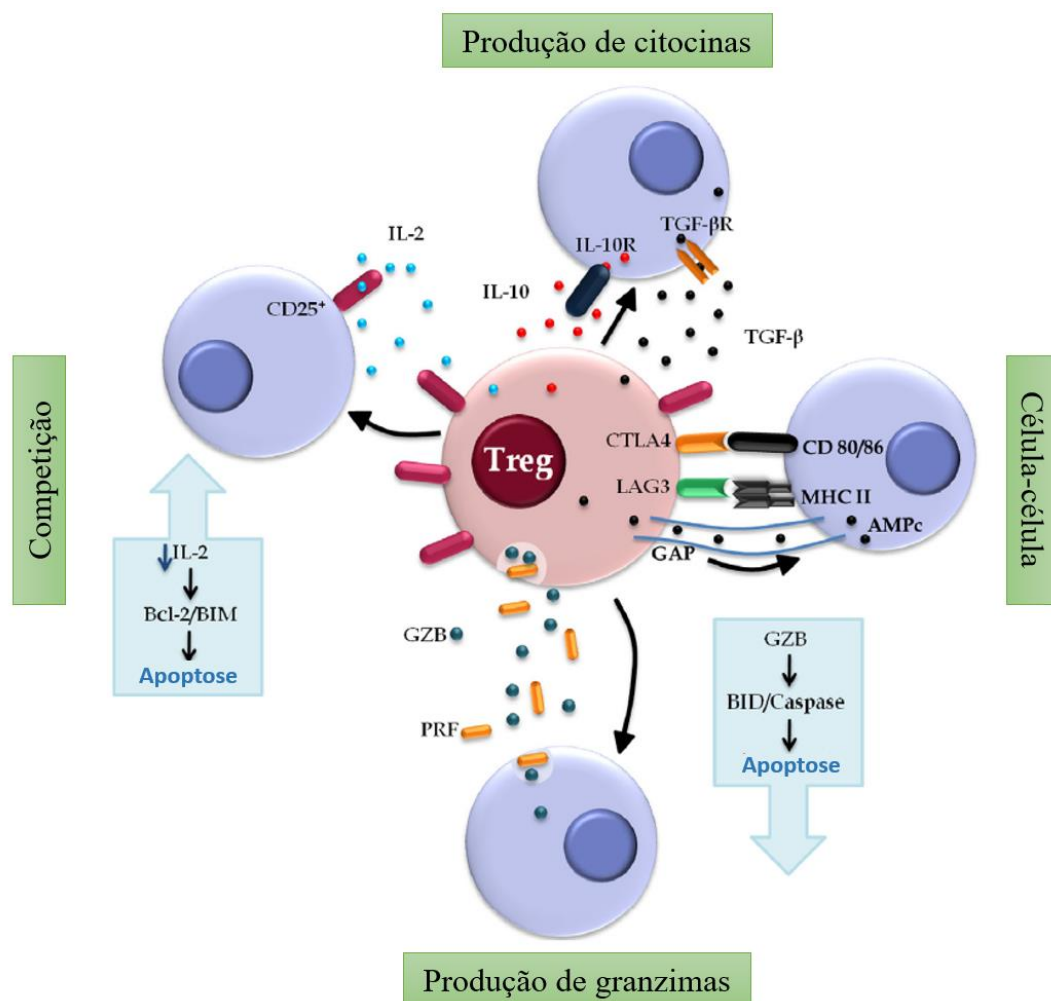
31

32

33

34

1 **Figura 2** — Mecanismos supressores de células T reguladoras.



2

3 **Fonte:** PEREIRA et al., (2017, p. 6, tradução nossa). Treg: células T reguladoras;
 4 CTLA-4: antígeno-4 de linfócito T citotóxico; Bcl 2: proteína 2 do linfoma de células B; BIM:
 5 via BIM; LAG3: gene 3 de ativação de linfócitos; TGF-β: fator de transformação do crescimento
 6 beta; AMPc: adenosina monofosfato cíclica; IL: interleucina; GZB: granzima B; PRF: perforina;
 7 BID: via BID; MHC II: complexo de histocompatibilidade.

8

9 Vários estudos têm relatado o comprometimento do número e/ou função de
 10 células Treg em doenças autoimunes, tais como diabetes mellitus tipo I (LINDLEY et
 11 al., 2005), esclerose múltipla (EM) (VIGLIETTA et al., 2004), artrite reumatoide (AR)
 12 (CAO et al., 2003), psoríase (SUGIYAMA et al., 2005) e LES (LIU et al., 2004).

13 No LES, o defeito ou ausência de células Treg parece contribuir com a
 14 patogênese e a atividade da doença. Experiências com transferência de células Treg
 15 em camundongos com LES mostraram que elas retardam a progressão da doença e
 16 reduzem a mortalidade neste modelo animal (SCALAPINO et al., 2006; WEIGERT et

1 al., 2013). No entanto, o papel definitivo das células Treg no LES permanece incerto
2 e os achados quanto ao número e função destas células no LES ainda são
3 contraditórios (SCHMIDT et al., 2017).

4 Alguns estudos relataram redução do número ou comprometimento da função
5 de células Treg em pacientes com LES (BONELLI et al., 2008; VALENCIA et al.,
6 2007), enquanto outro não observou qualquer alteração quanto ao número ou função
7 (VARGAS-ROJAS et al., 2008). Por outro lado, um grupo de pesquisadores encontrou
8 um número aumentado de células Treg em pacientes com LES, o que correlacionaram
9 com a atividade da doença (LIN et al., 2007). O número e a função das células Treg
10 podem variar dependendo do início da doença, das intervenções terapêuticas
11 utilizadas e dos períodos de atividade da doença (OHL; TENBROCK, 2015).

12 O avanço significativo na análise das células Treg envolveu a identificação da
13 expressão do gene de transcrição *FOXP3*, necessário para o desenvolvimento,
14 manutenção e funcionamento de células Treg (DARIO A. A. VIGNALI, 2008; HORI S,
15 NOMUTA T, 2003). Estudos já demonstraram que a quantidade de *FOXP3* expresso
16 em células Treg é fundamental para a manutenção de suas funções supressoras
17 (DEVAUD; DARCY; KERSHAW, 2014; WAN; FLAVELL, 2007), e que anormalidades
18 na sua expressão podem interferir diretamente no funcionamento e produção destas
19 células o que prejudicaria sua resposta supressora na prevenção da autoimunidade
20 (CRETNEY; KALLIES; NUTT, 2013).

21 1.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3 E SUAS VARIANTES GENÉTICAS

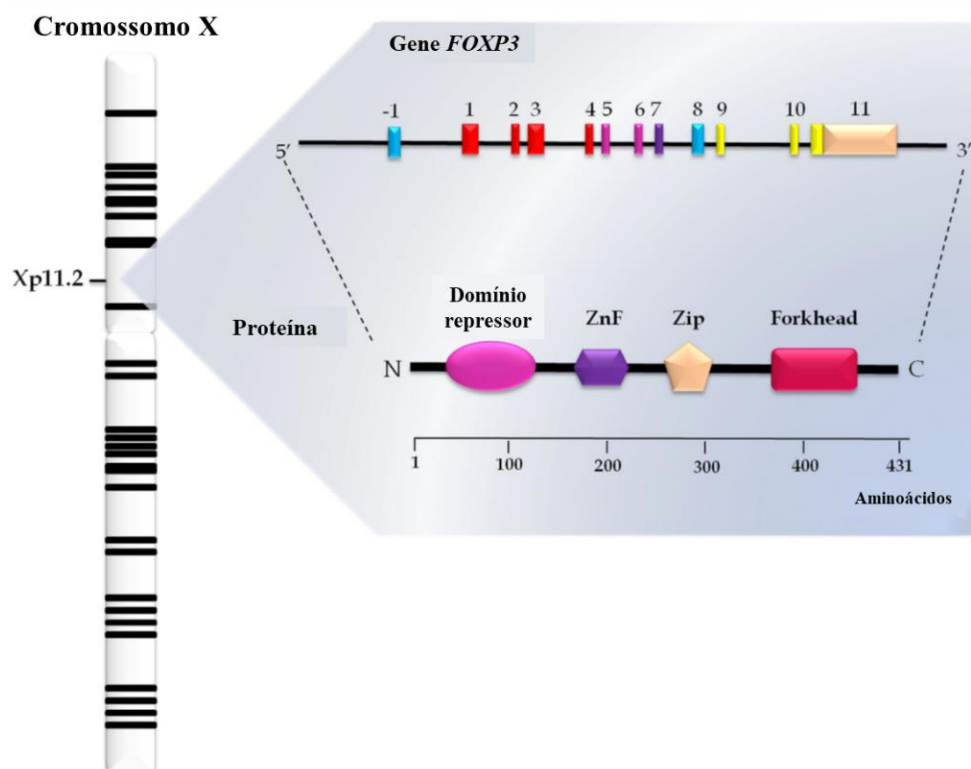
22 O gene *FOXP3* localizado no braço curto (p) do cromossomo X (Xp11.23) é
23 composto por 11 éxons e codifica a proteína FoxP3 da família de fatores de transcrição
24 (*forkhead transcription factor 3*) (OWEN et al., 2006). A proteína FoxP3 é um fator de
25 transcrição composto de 431 aminoácidos e que apresenta um domínio de ligação ao
26 DNA conhecido como *forkhead/winged helix* (STROUD et al., 2006). Além do domínio
27 *forkhead* localizado na porção C-terminal, esta proteína também apresenta um
28 domínio central que engloba regiões de Zinco C2H2 (ZnF) e leucina (LeuZip), e outro
29 domínio repressor na porção N-terminal (Figura 3) (LOPES et al., 2006).

30

31

32

1 **Figura 3** — Organização genômica e estrutural do *FOXP3*.



2
3 **Fonte:** PEREIRA et al. (2017, p. 2, tradução nossa). *FOXP3*: *forkhead box P3*; ZnF:
4 região de Zinco C2H2; Zip: região de leucina; N: porção N-terminal; C: porção C-terminal.

5
6 A expressão do *FOXP3* ocorre predominantemente em células T CD4⁺ e está
7 diretamente envolvida nos processos de regulação, ativação e diferenciação de
8 células T (CAMPBELL; KOCH, 2011; CHENG; GUO; MING, 2018). O FoxP3 é
9 responsável por diferenciar células T CD4⁺ *naïves* em células Treg e atua como
10 importante marcador e regulador destas células (DING; XU; BROMBERG, 2012;
11 FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003). Por sua vez, as células Treg CD4⁺CD25⁺
12 que expressam o *FOXP3* são responsáveis pela supressão de respostas imunes
13 excessivas e manutenção da homeostasia e autotolerância (ALEXANDER Y.
14 RUDENSKY, 2011; SAKAGUCHI et al., 2008).

15 Embora vários sinais que induzem a expressão de *FOXP3* tenham sido
16 identificados, os mecanismos exatos pelos quais a expressão do *FOXP3* é controlada
17 em células Treg ainda são controversos (TAO et al., 2017). Dados sugerem que a
18 ação sinérgica de sinais de transcrição e moléculas coestimulatórias aos TCR e
19 receptores de citocinas sejam necessários para a transcrição ativa do *FOXP3*
20 (HUEHN; BEYER, 2015; HUEHN; POLANSKY; HAMANN, 2009).

1 Estudos têm relacionado a disfunção do *FOXP3* com a suscetibilidade a
2 doenças como câncer de mama, pulmão e colorretal (CHENG; GUO; MING, 2018), e
3 doenças autoimunes (HE et al., 2013). Variantes genéticas do *FOXP3* também têm
4 sido associadas ao desenvolvimento do LES (D'AMICO et al., 2017; LIN et al., 2011).
5 Estas variantes podem modificar funcionalmente e quantitativamente a proteína
6 FoxP3, levando a uma diminuição da funcionalidade de células Tregs e
7 consequentemente, diminuição da supressão imune (COFFER; BURGERING, 2004).

8 Na literatura foram descritas algumas variantes genéticas de base única (SNV)
9 em diferentes regiões do gene *FOXP3* como a região promotora, intrônica e exônica
10 (GAO et al., 2010; HE et al., 2013). As regiões promotoras são as principais candidatas
11 para a presença de SNVs, uma vez que estão envolvidas no processo de iniciação da
12 transcrição e em muitos elementos que regulam a expressão gênica
13 (HOOGENDOORN et al., 2003). Nesta região já foram descritas inúmeras SNVs: -
14 3279 C>A (rs3761548); -924 A>G (rs2232365); -6050 TAATA (rs3060515); -5906 T>A
15 (rs 2869211); -3499 A>G (rs3761547); -2383 C>T (rs3761549); -1383 C>T
16 (rs2232364). Na região intrônica foram descritas: IVS1 +87 G>T (rs2232366); IVS5 -
17 20 G>A (rs2232368); IVS9 +459 A>G (rs2280883), enquanto que na região exônica
18 foram descritas SNVs nas regiões 1, 2, 3-4, 5-6, 7-8, 9, 10, 11 e 12 (GAO et al., 2010;
19 OWEN et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

20 No LES, as análises das variantes genéticas do *FOXP3* ainda são pouco
21 exploradas. Até o presente momento somente três estudos avaliaram a associação
22 das variantes genéticas do *FOXP3* com a suscetibilidade, manifestações clínicas e
23 marcadores imunológicos desta doença (D'AMICO et al., 2017; LIN et al., 2011; LAN
24 et al., 2010).

25 Lan e colaboradores (2010) avaliaram a associação das variantes -2383 C>T e
26 -3281 C>A do *FOXP3* com o LES, em 120 pacientes e 160 indivíduos controles do sul
27 da China. A distribuição da variante -2383 C>T apresentou diferença significativa entre
28 os grupos analisados e o risco relativo de LES foi 1,7 vezes maior nos portadores do
29 alelo -2383T do que o alelo -2383C. A frequência dos haplótipos -2383T/-3281A em
30 pacientes com LES foi significativamente maior do que no grupo controle, além do
31 alelo -2383T/-3281A ter sido significativamente associado ao maior risco de LES.
32 Dessa forma, os autores concluíram que a variante -2383C>T do *FOXP3* estava
33 associada a doença e que o alelo -2383T é um fator de risco para o LES na população
34 estudada (LAN et al., 2010).

1 Lin e colaboradores (2011) avaliaram a correlação de cinco variantes do
2 *FOXP3* (-6054 del>ATA, -3499 A>G, -3279 C>A, -2383 C>T e +459 C>T) com a
3 ocorrência de manifestações clínicas do LES. Foram avaliados 181 controles
4 saudáveis e 172 pacientes com LES, estratificados pela presença NL e de marcadores
5 imunológicos (ANA, anti-dsDNA, C3 e C4). Foi observado associação do alelo -6054
6 ATA com menor risco de NL (36,3% com alelo ATA *versus* 63,6% com deleção dos
7 alelos), indicando o possível papel protetor desta variante na ocorrência de NL.
8 Também observaram associação do alelo -3279 A com baixos níveis de anti-dsDNA
9 em mulheres com LES. Esses dados demonstraram que as variantes genéticas do
10 *FOXP3* interferem no aparecimento de manifestação renal e nos níveis de anti-dsDNA
11 (LIN et al., 2011).

12 D'Amico e colaboradores (2017) avaliaram a associação da variante genética
13 rs2294020 localizada no gene *CCDC22*, em proximidade com o gene *FOXP3*, com a
14 suscetibilidade às doenças autoimunes. O estudo analisou 189 pacientes com LES e
15 180 indivíduos controle. Foi observada associação significativa entre a presença da
16 variante rs2294020 com a suscetibilidade ao LES. No entanto, não houve associação
17 com as manifestações clínicas da doença. Além disso, o estudo também revelou
18 associação da variante genética com a suscetibilidade a outras doenças autoimunes
19 como vitiligo e psoríase (D'AMICO et al., 2017).

20 Nosso grupo de pesquisa avaliou a associação das variantes -3279 C>A
21 (rs3761548) e -924 A>G (rs2232365) do *FOXP3* em doenças autoimunes como EM
22 (FLAUZINO et al., 2019), AR (SELLA, 2019) e doença inflamatória intestinal (DII)
23 (INOUE, 2020). Sella (2019), demonstrou que a variante -3279 C>A não foi
24 significativamente associada com a susceptibilidade à AR. Entretanto, pacientes com
25 AR e presença do alelo C, em homozigose ou heterozigose, apresentaram níveis
26 plasmáticos reduzidos de TGF- β 1 e maior frequência de pacientes com doença em
27 atividade. Na EM, a variante -3279 C>A foi associada ao diagnóstico da doença e os
28 genótipos CA+AA foram associados aos níveis plasmáticos mais elevados de TGF-
29 β 1, quando comparado com o genótipo CC. Sugerindo que o alelo A da variante -3279
30 C>A pode exercer papel no número e função das células Treg e pode ser um dos
31 fatores envolvidos na suscetibilidade das mulheres à EM (FLAUZINO et al., 2019). E
32 na DII, as variantes -924 A>G e -3279 C>A foram associadas com o diagnóstico de
33 doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU), respectivamente. A presença do
34 haplótipo GAGA foi associado a maior chance de diagnóstico de DII e RCU, assim

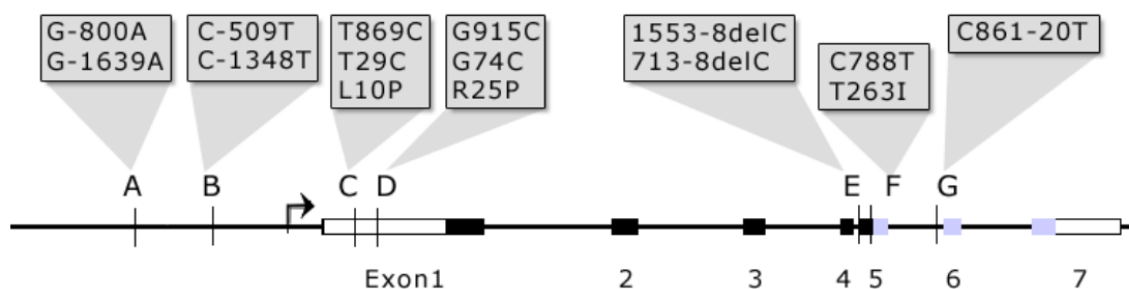
1 como, com menores níveis plasmáticos de TGF- β 1. Já o haplótipo G/C analisado no
2 modelo dominante demonstrou um efeito protetor para DC e foi associado à menor
3 atividade endoscópica. Estes resultados reforçaram que as variantes do *FOXP3*
4 analisadas individualmente ou em estruturas haplotípicas exercem um papel
5 fundamental na suscetibilidade e patogênese da DII (INOUE, 2020).

6 1.4 VARIANTES GENÉTICAS DO *TGFB1* E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

7 O TGF- β é uma citocina multifuncional com papel importante nos processos
8 biológicos como replicação celular, diferenciação, migração, apoptose, formação
9 óssea, angiogênese e regulação do sistema imunológico (CHIN et al., 2004). Pode ser
10 gerado por células imunes das respostas inatas e adaptativas, incluindo linfócitos T,
11 células dendríticas e monócitos/macrófagos (YOSHIMURA; WAKABAYASHI; MORI,
12 2010) e exercer propriedades pró-inflamatórias e imunorregulatórias sobre diversos
13 microambientes (LI et al., 2006).

14 Existem três isoformas de TGF- β identificadas em mamíferos (TGF- β 1, TGF-
15 β 2, TGF- β 3), sendo TGF- β 1 a mais abundante e ubiquamente expressa. As três
16 isoformas compartilham regiões de similaridade em seus aminoácidos e cada uma
17 surge de genes localizados em cromossomos diferentes (CHIN et al., 2004). O gene
18 responsável pela produção de TGF- β 1 está localizado no braço longo do cromossomo
19 19 (19q.13.2) e organizado em 7 éxons (FUJII et al., 1986). Algumas variantes já foram
20 descritas na região reguladora deste gene, como; -1550-/AGG (rs11466313), -988
21 C>A (rs1800820), -902 C>T, -800 G>A (rs1800468), -509 C>T (rs1800469), +72-/C
22 (rs1800999), +869 T>C (rs1982073/rs1800470) e +915 G>C (rs1800471) (Figura 4).
23 Dentre essas variantes, três (-509 C>T, +869 T>C, +915 G>C) foram relatadas estar
24 diretamente associadas com a produção de TGF β -1 (TZAKAS et al., 2005).

25
26
27
28
29
30
31
32

1 **Figura 4 – Estrutura genômica do *TGFB1***

2
3
4 **Fonte:** TZAKAS et al. (2005, p. 2, tradução nossa). As letras de A-G representam
5 cada locus em relação à região promotora, as setas indicam o local de início da
6 transcrição, os éxons são representados em retângulos, os pré-propeptídeos em
7 retângulos brancos, propeptídeos em retângulos pretos e a sequência madura em
8 retângulos cinza. Os SNVs (nomeados de forma diferente por diferentes
9 pesquisadores) são fornecidos nas caixas sombreadas.

10
11 As variantes genéticas do *TGFB1* têm sido associadas à suscetibilidade e
12 parâmetros clínicos de várias doenças, incluindo doença arterial coronariana (XU et al.,
13 2014), doença pulmonar obstrutiva crônica (CELEDÓN et al., 2004), infarto
14 (BARSOVA et al., 2012), risco de acidente vascular cerebral (AVC) (SIE et al., 2006),
15 cânceres (DUNNING et al., 2003; SLATTERY et al., 2011) e doenças autoimunes
16 como EM (SCHRIJVER, et al., 2004) e AR (MATTEY et al., 2005).

17 No LES, as variantes da região codificadora e promotora do gene *TGFB1*, e
18 consequentemente, os níveis alterados de TGF- β 1, têm demonstrado influenciar a
19 suscetibilidade e manifestações clínicas da doença (REZAEI et al., 2015). Um estudo
20 prévio demonstrou que pacientes com LES apresentavam níveis plasmáticos mais
21 baixos de TGF- β 1 do que indivíduos saudáveis e que a produção desta citocina estava
22 inversamente correlacionada com a gravidade da doença (OHTSUKA et al., 1999).

23 Caserta e colaboradores (2004) selecionaram 23 pacientes com LES e 32
24 controles saudáveis, e avaliaram a associação da variante -509 C>T do *TGFB1* com
25 a presença de LES e Síndrome de Sjogren. Não foi observado associação significativa
26 entre os genótipos da variante -509 C>T e LES ou Síndrome de Sjogren. No entanto,
27 na análise das frequências alélicas demonstrou que a frequência do alelo C está
28 diminuída no grupo Síndrome de Sjogren quando comparado aos controles, embora
29 a diferença não tenha alcançado significância estatística. Os autores concluem a partir

1 dos resultados, que a variante -509 do *TGFB1* não está significativamente associada
2 com o LES e a Síndrome de Sjogren, e que provavelmente este não seja um fator de
3 risco importante para o desenvolvimento das duas doenças (CASERTA et al., 2004).

4 Lu e colaboradores (2004) realizaram um estudo para esclarecer se a
5 desregulação pelo TGF- β 1 é determinada geneticamente. Um total de 138 pacientes
6 com LES e 182 controles foram genotipados para 5 SNVs do *TGFB1*: -988 C>A, -800
7 G>A, -509 C>T, Leu10/Pro10 e Arg25/Pro25. Os pacientes com LES apresentaram
8 níveis séricos mais baixos de TGF- β 1 em comparação com os controles e nenhum
9 dos SNVs analisados foi fortemente associado ao LES ou ao prognóstico de NL.
10 Dessa forma, concluíram que essas variantes não representam uma predisposição
11 genética para o desenvolvimento do LES (LU et al., 2004).

12 Wang e colaboradores (2007) avaliaram a associação da variante +869 T>C do
13 *TGFB1* com a patogênese do LES em 196 pacientes japoneses. O genótipo e as
14 frequências alélicas não diferiram entre o grupo LES e controle. No entanto, em
15 comparação aos genótipos TC e CC, o genótipo TT foi associado à maior produção
16 de anticorpos anti-Ro e maior incidência de necrose asséptica; enquanto que o
17 genótipo CC apresentou maior frequência de anticorpos anti-RNP em comparação
18 aos pacientes com os genótipos TC e TT. Esses resultados sugerem que a variante
19 +869 T>C do *TGFB1* pode estar envolvida no desenvolvimento de autoanticorpos e
20 na ocorrência de necrose asséptica em pacientes com LES (WANG et al., 2007).

21 Sayed e colaboradores (2014) investigaram a associação da variante +869 T>C
22 do *TGFB1* com a susceptibilidade ao LES, manifestações clínicas, NL e níveis séricos
23 de TGF- β 1 em uma população de 56 pacientes com LES e 40 controles saudáveis. O
24 genótipo e as frequências alélicas não diferiram entre os grupos. Pacientes com LES
25 apresentaram níveis séricos reduzidos de TGF- β 1 quando comparado ao controle.
26 Níveis reduzidos de TGF- β 1 foram observados em pacientes com NL, em relação à
27 pacientes sem NL. O TGF- β 1 foi significativamente reduzido no grupo TT do que nos
28 grupos CC e TC. Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre os níveis
29 séricos de TGF- β 1 com o escore SLEDAI e as manifestações clínicas. Dessa forma,
30 os autores concluíram que a variante +869 T>C não está associada à suscetibilidade
31 e manifestações clínicas da doença. No entanto, a variante pode levar a baixa
32 produção de TGF- β 1, principalmente no genótipo TT e, conseqüentemente,
33 desempenhar papel importante no desenvolvimento de lesão renal (SAYED et al.,
34 2014).

1 Os resultados entre os diferentes estudos são conflitantes, e ainda não existe
2 um consenso do papel das variantes do *TGFB1* na suscetibilidade, atividade e
3 manifestações clínicas do LES. Além disso, até o presente momento, nenhum estudo
4 foi realizado na população brasileira. Portanto, este é o primeiro estudo brasileiro a
5 avaliar a associação das variantes -509 C>T e +869 T>C do *TGFB1* com a
6 suscetibilidade, atividade e níveis plasmáticos de citocinas em pacientes com LES.

7 1.5 TRATAMENTO

8 A compreensão dos mecanismos imunes envolvidos na patogênese do LES
9 evoluiu muito durante os últimos anos o que permitiu o reconhecimento de potenciais
10 alvos imunológicos, além do desenvolvimento de drogas dirigidas contra moléculas
11 específicas e alvos envolvidos no processo autoimune (SAMOTIJ; REICH, 2019).

12 Atualmente, as principais terapias utilizadas no LES incluem hidroxicloroquina
13 (HCQ), glicocorticoides (GC) e drogas imunossupressoras como o metotrexato (MTX),
14 azatioprina (AZA), micofenolato mofetil (MMF), ciclofosfamida (CYC) e rituximabe
15 (RTX) (FANOURIKIS et al., 2019). A HCQ é o antimalárico mais comumente
16 prescrito e um dos poucos medicamentos licenciados para o tratamento do LES.
17 Apresenta boas evidências de eficácia e segurança, sendo utilizada quando há
18 envolvimento da pele e das articulações, mialgia, febre, fadiga e pleurisia, e para evitar
19 o desenvolvimento de doença renal e dano crônico (RUIZ-IRASTORZA et al., 2010).

20 Os GC podem fornecer alívio rápido dos sintomas, no entanto, a terapia a longo
21 prazo pode apresentar efeitos prejudiciais que incluem danos irreversíveis a alguns
22 órgãos (BRUCE et al., 2015). Dessa forma, a dose de GC deve ser reduzida conforme
23 a atividade da doença melhora até a menor dose de manutenção possível e
24 interrompida, se possível, à medida que outros agentes imunossupressores sejam
25 inseridos na terapia (GORDON et al., 2018).

26 O MTX, embora não licenciado para o tratamento do LES, tem sido utilizado
27 em doses baixas (10 mg/semana) para reduzir a atividade da doença, controlar a
28 artrite inflamatória e as erupções cutâneas do LES (KIPEN; LITTLEJOHN; MORAND,
29 1997; WONG; ESDAILE, 2005). Deve ser utilizado em pacientes que inicialmente
30 falharam ao uso de HCQ e GC de baixa dosagem e também pode ser utilizado em
31 associação com a HCQ para evitar o uso ou promover a redução da dose de GC
32 (FANOURIKIS et al., 2019; GORDON et al., 2018).

1 O MMF demonstrou que, em combinação com os GC, reduz a atividade do
2 LES, reduz as crises renais e não-renais e tem apresentado boa tolerância (GORDON
3 et al., 2018). Tem sido cada vez mais utilizado como tratamento da primeira linha da
4 NL grave devido a sua margem terapêutica mais ampla em comparação, por exemplo,
5 com a CYC (MOK; LAI, 2002). Além de apresentar propriedades imunossupressoras,
6 o MMF também é benéfico para o retardo da progressão da aterosclerose (GIBSON;
7 HAYDEN, 2007).

8 Estratégias de imunoterapia com base no uso de células Treg têm representado
9 uma nova abordagem terapêutica para controle do processo inflamatório no LES
10 (DEJACO et al., 2006). O objetivo do tratamento dirigido com células Treg é
11 reestabelecer a auto tolerância fisiológica e aumentar o efeito supressor de nTreg
12 sobre as células T autorreativas sem ocasionar os efeitos adversos associados ao uso
13 de terapia imunossupressora a longo prazo (MIYARA; ITO; SAKAGUCHI, 2014).

14 As vantagens da transferência adotiva de células Treg no tratamento do LES
15 são numerosas e incluem: (a) direcionamento da terapia conforme a especificidade
16 antigênica; (b) indução de uma imunorregulação *in vivo* mais duradoura; e (c)
17 possibilidade de padronização de terapias individualizadas a fim de minimizar os
18 efeitos adversos (CRUVINEL et al., 2008). No entanto, apesar dos benefícios, existem
19 dificuldades quanto à identificação de células Treg confiáveis e à determinação do
20 número suficiente de células para fins terapêuticos que limitam seu uso
21 (BLUESTONE, 2005). Também existem preocupações quanto a preservação do
22 fenótipo e da função regulatória de células Treg frente a ambientes proinflamatórios
23 como observado no LES (GIANG; LA CAVA, 2016). A neutralização dessas citocinas
24 inflamatórias desestabilizadoras de Treg como TNF- α e IL-6 no ambiente autoimune
25 seria crucial para aumentar a função supressora de células Treg e,
26 consequentemente, aumentar as chances de restaurar o controle imunológico perdido
27 (TAO et al., 2017). Além disso, a terapia de transferência de células Treg também
28 pode não alcançar a eficácia desejada devido à heterogeneidade das células Treg e
29 possíveis instabilidades na expressão do *FOXP3* (TAO et al., 2017).

30 Embora ainda não exista um tratamento ideal para o LES, é provável que, nos
31 próximos anos, novas terapias sejam desenvolvidas (DORIA et al., 2017) a fim de
32 alcançar a remissão da doença, a prevenção do acúmulo de danos e a melhora da
33 qualidade de vida de pacientes com LES (FANOURIAKIS et al., 2019).

1 2 JUSTIFICATIVA

2 A fisiopatologia do LES ainda não está totalmente elucidada e diversos fatores
3 etiológicos parecem causar as anormalidades imunes observadas na doença. Sabe-
4 se que fatores genéticos podem estar associados à suscetibilidade e prognóstico do
5 LES, enquanto os fatores ambientais são responsáveis pelo seu desencadeamento e
6 modulação. As variantes genéticas, associadas à diferenciação e modulação de
7 células imunes e à produção de citocinas, podem alterar as respostas imunes inata e
8 adaptativa e a imunotolerância e influenciar no aparecimento, progressão e gravidade
9 da doença. Embora resultados promissores tenham demonstrado o envolvimento das
10 variantes genéticas *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548), *FOXP3* -924 A>G (rs2232365),
11 *TGFB1* +869 T>C (rs1800470) e *TGFB1* -509 C>T (rs1800469) em algumas doenças
12 autoimunes, no LES os dados ainda são escassos e muitas vezes controversos. Desta
13 forma, torna-se fundamental determinar o envolvimento destas variantes genéticas na
14 suscetibilidade e nos parâmetros clínicos e laboratoriais da doença, possibilitando o
15 melhor conhecimento da fisiopatologia assim como a possível identificação de novos
16 candidatos a biomarcadores e alvos terapêuticos.

1 3 OBJETIVOS

2 3.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar a associação das variantes genéticas *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548),
4 *FOXP3* -924 A>G (rs2232365), *TGFB1* +869 T>C (rs1800470) e *TGFB1* -509 C>T
5 (rs1800469) com a suscetibilidade e parâmetros clínicos e laboratoriais do LES.

6 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7 – Comparar a frequência das variantes genéticas do *FOXP3* (rs3761548 e
8 rs2232365) e do *TGFB1* (rs1800470 e rs1800469) em pacientes com LES e
9 indivíduos controles;
- 10 – Associar as variantes genéticas do *FOXP3* (rs3761548 e rs2232365) e do
11 *TGFB1* (rs1800470 e rs1800469), isoladamente e em haplótipo, com a
12 suscetibilidade e atividade do LES;
- 13 – Avaliar a associação das variantes genéticas do *FOXP3* (rs3761548 e
14 rs2232365) e do *TGFB1* (rs1800470 e rs1800469) com a presença de
15 autoanticorpos;
- 16 – Determinar a associação das variantes genéticas do *FOXP3* (rs3761548 e
17 rs2232365) com a presença de nefrite lúpica.
- 18 – Verificar a associação das variantes genéticas do *FOXP3* (rs3761548 e
19 rs2232365) e do *TGFB1* (rs1800470 e rs1800469), com os níveis plasmáticos
20 de TGF-β1 em pacientes com LES;

1 4 SUJEITOS E MÉTODOS

2 4.1 ASPECTOS ÉTICOS E CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

3 O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
4 Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com o
5 CAAE: 01865212.0.0000.5231 (Anexo C) e o termo de consentimento livre e
6 esclarecido (TCLE) (Apêndice A) foi obtido de todos os participantes envolvidos no
7 estudo. A pesquisa foi conduzida em conformidade com as normas estabelecidas de
8 experimentação humana, de acordo com os princípios expressos na Declaração de
9 Helsinque.

10 4.2 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO

11 Este é um estudo caso-controle, prospectivo, em que foram selecionados 368
12 participantes no total, de ambos os sexos, com idade entre 18 a 69 anos, subdivididos
13 em dois grupos: Grupo controle (n=165), indivíduos saudáveis, selecionados entre os
14 doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e Grupo LES (n=203),
15 pacientes com LES selecionados no Ambulatório de Reumatologia do Hospital
16 Universitário de Londrina - Paraná/Brasil, durante os anos de 2014 a 2018. O
17 diagnóstico de LES foi definido de acordo com os critérios do ACR revisados em 2012
18 (PETRI et al., 2012) (Anexo D), e a atividade da doença foi determinada pelo escore
19 SLEDAI-2K, sendo SLEDAI ≥ 6 considerado moderada e alta atividade, enquanto que
20 SLEDAI < 6 doença inativa ou leve atividade. (Anexo B) (PETRI et al., 1991;
21 GLADMAN; IBANEZ; UROWITZ, 2002). A NL foi diagnosticada com base no histórico
22 médico ou pela presença de proteinúria ($\geq 0,5g / 24h$) e/ou hematúria, ou achado
23 patológico no sedimento urinário, com ou sem aumento dos níveis de creatinina (SUI
24 et al., 2013). Os critérios de exclusão foram: presença de outras doenças
25 inflamatórias, infecciosas, autoimunes e neoplásicas.

26 Informações sobre o histórico médico, tratamento para o LES e o estilo de vida
27 foram obtidos na avaliação clínica realizada pelo médico reumatologista. Informações
28 como a duração da doença, utilização de medicamentos anti-inflamatórios,
29 corticoides, antimaláricos, contraceptivos orais, anti-hipertensivos e também
30 suplementos com vitaminas antioxidantes, foram registradas para cada paciente e

1 controle (Apêndice B). Os indivíduos do estudo relataram não fazer o uso de bebidas
2 alcoólicas regularmente.

3 O peso corporal foi avaliado com aproximação de 0,1 kg utilizando uma balança
4 eletrônica e com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da
5 manhã; a altura foi medida com precisão de 0,1 cm, utilizando-se um estadiômetro. O
6 índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m)
7 ao quadrado.

8 4.3 COLETA, ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

9 Após jejum de 12 horas, as amostras de sangue venoso foram colhidas
10 utilizando tubos coletores estéreis (BD Vacutainer® UltraTouch™, Franklin Lakes, NJ,
11 EUA), sem ou com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As
12 amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min e armazenadas em alíquotas de
13 plasma, soro e *buffy coat* à uma temperatura de -80° C até o momento das análises
14 quando as análises não eram realizadas no mesmo dia.

15 4.4 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES LABORATORIAIS

16 Os níveis séricos dos componentes do sistema complemento C3 e C4 foram
17 avaliados por turbidimetria (C8000™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA)
18 seguindo as orientações do fabricante. ANAs foram determinados por
19 imunofluorescência indireta (IFI) utilizando células HEp-2 (*IFI-ANA-HEp2-IgG*, Viro-
20 *Immun-Labor-Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany*) e considerado resultado
21 positivo quando os títulos foram $\geq 1:80$. Os autoanticorpos (anti-dsDNA, anti-
22 nucleossomo, anti-Sm e anti-U1RNP) foram quantificados por imunoenensaio
23 enzimático indireto (*ELISA*, *Orgentec Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany*) e
24 considerado resultado positivo quando os valores obtidos foram ≥ 20 IU/mL. Os níveis
25 plasmáticos de TGF- β 1 foram determinados por ensaio magnético de microesferas
26 utilizando kit *singleplex* (ProcartaPlex by Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria)
27 para plataforma Luminex® utilizando o equipamento MAGPIX® (*Luminex Corporation,*
28 *Austin, USA*).

1 4.5 VARIANTES GENÉTICAS

2 4.5.1 Extração do DNA

3 A extração do DNA genômico a partir das amostras de *buffy-coat* foi realizada
4 pelo método de separação em coluna, com reagentes comercialmente disponíveis
5 (*Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brasil*) e de acordo com as instruções
6 fornecidas pelo fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas utilizando o
7 espectrofotômetro NanoDrop 2000c™ (*ThermoScientific, Waltman, MA, USA*) a 260
8 nm e a pureza foi avaliada pela razão 260/280 nm.

9 4.5.2 Variantes Genéticas do *FOXP3*

10 As variantes genéticas do *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) e -924 A>G
11 (rs2232365) foram avaliadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida por
12 polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP).

13 4.5.2.1 PCR para as variantes -3279 C>A (rs3761548) e -924 A>G (rs2232365) do 14 *FOXP3*.

15 Aproximadamente 100 ng de DNA foram utilizados para amplificar a sequência
16 de 155 pares de base (pb) (rs3761548) e 249 pb (rs2232365) do *FOXP3*, utilizando a
17 PCR de acordo com os protocolos descritos na literatura, com algumas modificações
18 (BANIN HIRATA et al., 2017). Os *primers* utilizados para a amplificação das
19 sequências de 155 pb e 249 pb do gene *FOXP3*, foram sintetizados de acordo com a
20 sequência depositada no *GenBank* sob número NT_0073921. Para a variante
21 rs2232365, o *primer forward* é formado pela sequência 5' AGG AGA AGG AGT GGG
22 CAT TT 3' e o *primer reverse* é formado pela sequência 5' TGT GAG TGG AGG AGC
23 TGA GG 3' (PARADOWSKA-GORYCKA et al., 2015). Enquanto que para a variante
24 rs3761548, o *primer forward* é formado pela sequência 5' GGC AGA GTT GAA ATC
25 CAA GC 3' e o *primer reverse* é formado pela sequência 5' CAA CGT GTG AGA AGG
26 CAG AA 3' (HE et al., 2013).

27 A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 0,25 mM
28 de cada *primer*, 1,50 mM de MgCl₂, 0,10 mM de dNTP (*Invitrogen™, Life*

1 *Technologies, Carlsbad, CA, USA*), 1,25 U da enzima DNA polimerase recombinante
2 diluída em seu tampão 1X (20 mM de Tris-HCl pH: 8,4; 50 mM de KCl) (*Invitrogen™*,
3 *Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), e 100ng da amostra de DNA. A reação de
4 amplificação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems Veriti™ 96-well*
5 *Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA*), com um ciclo de
6 desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C; seguido por 35 ciclos de 30 segundos a
7 94°C para desnaturação, para o anelamento 30 segundos a 59°C para o rs2232365
8 ou 30 segundos a 65°C para o rs3761548 e 30 segundos a 72°C para extensão; e 10
9 minutos a 72°C para a extensão final. Todas as reações foram realizadas com um
10 controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos
11 nucleicos.

12 Para a análise da amplificação do gene *FOXP3*, 5 µL do produto por PCR e 5
13 µL do corante xileno cianol (XC) foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%. Em
14 cada eletroforese foi incluído o controle negativo, com ausência de DNA e o *ladder* de
15 50 pb (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) para determinar o
16 tamanho do fragmento de DNA amplificado. A eletroforese foi realizada a 100 V por
17 60 minutos com posterior coloração do gel com nitrato de prata (BANIN HIRATA et al.,
18 2017).

19 4.5.2.2 Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para a
20 variante rs2232365.

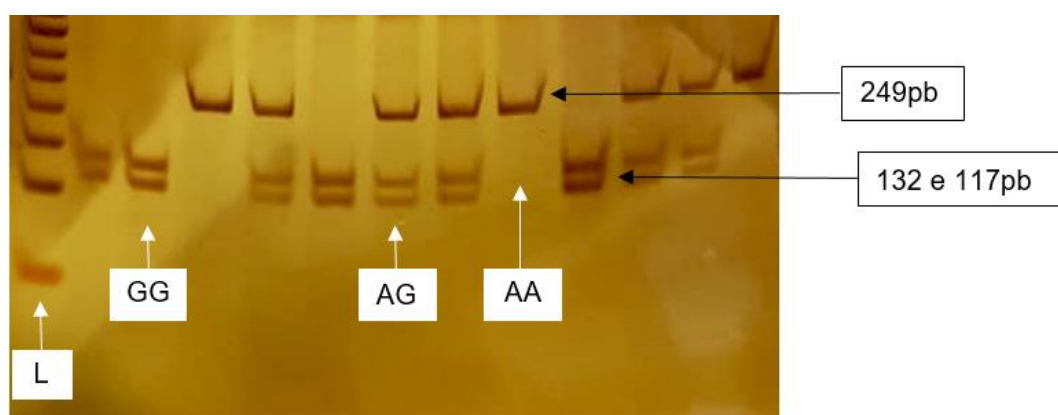
21 A partir dos produtos de amplificação da PCR, foi realizada a digestão
22 enzimática com a enzima de restrição *Esp3I* (*Anza™, Invitrogen, Life Technologies,*
23 *Carlsbad, CA, USA*). Cinco microlitros do produto da PCR foram digeridos com 0,3 µL
24 de enzima *Esp3I* 10U/µL *overnight* a 37°C em termobloco. Os produtos da digestão
25 enzimática foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, aplicando-
26 se 5 µL do produto de digestão enzimática de cada amostra e 5 µL de corante XC no
27 gel para a visualização dos fragmentos formados. A eletroforese foi realizada de
28 acordo com Banin Hirata et al. (2017). A análise dos fragmentos permitiu a
29 identificação dos três genótipos da variante estudada (Figura 5).

30 ■ AA representa o genótipo em homozigose sem o sítio de restrição,
31 apresentando somente um fragmento com 249 pb.

- 1 ▪ AG representa o genótipo em heterozigose, contendo três fragmentos na
2 eletroforese, com 132 pb e 117 pb (provenientes da clivagem do sítio de
3 restrição presente no alelo G) e 249 pb (proveniente do alelo A que não sofre
4 a ação da enzima).
- 5 ▪ GG representa o genótipo com homozigose para o sítio de restrição e
6 apresenta dois fragmentos com 132 pb e 117 pb.

7

8 **Figura 5** – Perfil eletroforético em gel de acrilamida, para caracterização dos
9 genótipos do rs2232365 *FOXP3* -924 A>G.



10

11 **Fonte:** Próprio autor. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% após coloração com
12 nitrato de prata caracterizando os três genótipos após a digestão com a enzima de restrição
13 Esp3I. L: *ladder* de DNA com 50 pb; genótipo AA (presença de um único fragmento com
14 249pb); genótipo GG (presença de dois fragmentos com 132 e 117pb); genótipo AG (presença
15 de três fragmentos com 249, 132 e 117pb).

16 4.5.2.3 Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para a
17 variante rs3761548.

18 A partir dos produtos de amplificação da PCR, foi realizada a digestão
19 enzimática com a enzima de restrição *Pst*I (*Anza*TM, *Invitrogen*, *Life Technologies*,
20 *Carlsbad*, *CA*, *USA*). Cinco microlitros do produto da PCR foram completamente
21 digeridos com 0,3 µL de enzima *Pst*I 10U/µL *overnight* a 37°C em termobloco. Os
22 produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de
23 poliacrilamida 10%, aplicando-se 5 µL do produto de digestão enzimática de cada
24 amostra e 5 µL de corante XC no gel para a visualização dos fragmentos formados. A
25 eletroforese foi realizada de acordo com Banin Hirata et al. (2017). A análise dos

1 fragmentos permitiu a identificação dos três genótipos da variante estudada (Figura
2 6).

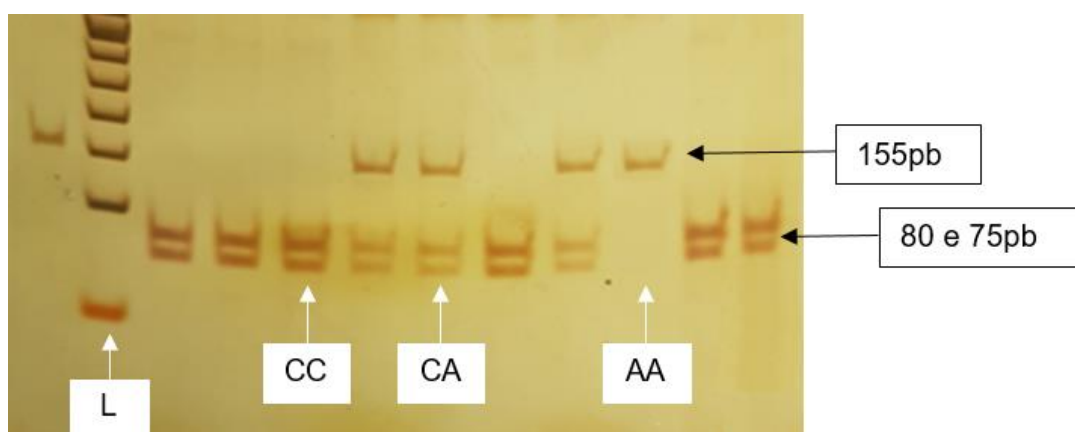
3 ▪ CC representa o genótipo com homozigose para o sítio de restrição e
4 apresenta dois fragmentos com 75 pb e 80 pb.

5 ▪ CA representa o genótipo em heterozigose, contendo três fragmentos na
6 eletroforese, com 75 pb e 80 pb (provenientes da clivagem do sítio de restrição
7 presente no alelo C) e 155 pb (proveniente do alelo A que não sofre a ação
8 da enzima).

9 ▪ AA representa o genótipo em homozigose sem o sítio de restrição,
10 apresentando somente um fragmento com 155 pb.

11

12 **Figura 6** – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, para caracterização
13 dos genótipos do rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A.



Fonte: Próprio autor. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% após coloração com nitrato de prata caracterizando os três genótipos após a digestão com a enzima de restrição *Pst*I. L: *ladder* de DNA com 50 pb; genótipo AA (presença de um único fragmento com 155 pb); genótipo CC (presença de dois fragmentos com 80 e 75 pb); genótipo CA (presença de três fragmentos com 155, 80 e 75pb).

14 4.5.3 Variantes Genéticas do *TGFB1*

15 As variantes genéticas do *TGFB1* +869 T>C (rs1800470) e -509 C>T
16 (rs1800469) foram genotipadas por meio de qPCR pelo método de TaqMan®. O
17 ensaio foi realizado utilizando 0,25 µL de *TaqMan SNP Genotyping Assay* 40X

1 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) contendo dois *primers* e duas sondas
 2 TaqMan® MGB alelo-específicas com um corante repórter na extremidade 5' (VIC®
 3 ou FAM®), conforme descrito no quadro 1,5 µL de *TaqMan Universal Genotyping*
 4 *Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)* e 5 ng de DNA genômico. Com
 5 volume final de reação de 10 µL. Os níveis de fluorescência foram avaliados pelo
 6 termociclador Step One (*Applied Biosystems da Life Techonologies, Carlsbad, CA,*
 7 *USA*).

8

9 **Quadro 1** — Sondas para genotipagem das variantes do *TGFB1*.

| Variante | Taqman assay | Sondas MGB fluorescentes |
|--|----------------|---|
| <i>TGFB1 +869 T>C</i> (<i>rs1800470</i>) | C__22272997_10 | [VIC/FAM] TAG CCA CAG CAG CGG TAG CAG CAG C[A/G]G CAG CCG CAG CCC GGA GGG CGG |
| <i>TGFB1 -509 C>T</i> (<i>rs1800469</i>) | C__8708473_10 | [VIC/FAM] GAG GAG GGG GCA ACA GGA CAC CTG A[A/G]G GAT GGA AGG GTC AGG AGG CAG ACA |

10 MGB: *minor groove binder*.

11 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

12 A análise estatística realizada foi a mesma para os dois artigos elaborados. Os
 13 dados categóricos foram avaliados pelo teste de qui-quadrado e expressos em
 14 número absoluto (n) e percentagem (%). Foram calculados a razão de chance (*odds*
 15 *ratio*-OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Os dados contínuos foram
 16 analisados pelo teste de Mann-Whitney e expressos como mediana e percentis (25%-
 17 75%). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SPSS
 18 para Windows, versão 22.0 (SPSS 31 Inc., CHIGADO, IL, EUA) e a significância
 19 estatística foi definida como $p < 0,05$. A inferência dos locais de recombinação entre
 20 os alelos do *FOXP3* e *TGFB1* foi determinada usando-se o *software* PHASE versão
 21 2.1.1, atribuindo cada haplótipo com probabilidade máxima (STEPHENS; SMITH;
 22 DONNELLY, 2001; STEPHENS; SCHEET, 2005). A associação dos haplótipos do
 23 *TGFB1* com a suscetibilidade ao LES foi avaliada pelo software SNPStat (Solé et al.,

1 2006). O equilíbrio de Hardy-Weinberg e a estimativa do desequilíbrio de ligação por
2 pares foram realizadas no *software Haploview* versão 4.2. O desequilíbrio de ligação
3 por pares entre os SNVs foi fornecido descrevendo o valor D e o quadrado do r.
4

1 5 RESULTADOS

2 Os resultados desta tese foram apresentados e discutidos em dois artigos
3 científicos:

4 Artigo1: **Haplotypes of *FOXP3* genetic variants are associated with**
5 **susceptibility, autoantibodies, and TGF- β 1 in patients with systemic lupus**
6 **erythematosus.** Submetido ao periódico *Scientific Reports* com fator de impacto de
7 4.576.

8 Artigo2: ***TGFB1* +869 T>C (rs1800470) variant is independently associated**
9 **with susceptibility and disease activity in systemic lupus erythematosus.**
10 Submetido ao periódico *Scientific Reports* com fator de impacto de 4.576.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1 5.1 ARTIGO 1

2 **Haplotypes of *FOXP3* genetic variants are associated with susceptibility, autoantibodies,**
3 **and TGF- β 1 in patients with systemic lupus erythematosus.**4
5 Nicole Perugini Stadtlober¹, Tamires Flauzino¹, Lorena Flor da Rosa Franchi Santos¹, Tatiana
6 Mayumi Veiga Iriyoda², Neide Tomimura Costa³, Marcell Alysson Batisti Lozovoy⁴, Isaias
7 Dichi⁵, Edna Maria Vissoci Reiche⁴, Andréa Name Colado Simão⁴.

- 8
-
- 9 1. Laboratory of Research in Applied Immunology, State University of Londrina, Londrina,
-
- 10 PR, Brazil
-
- 11 2. Department of Rheumatology, Pontifical Catholic University of Paraná, Londrina, PR,
-
- 12 Brazil
-
- 13 3. Department of Rheumatology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil
-
- 14 4. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Laboratory of Research in
-
- 15 Applied Immunology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil
-
- 16 5. Department of Internal Medicine, Laboratory of Research in Applied Immunology, State
-
- 17 University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

18
19 * Corresponding author: Andréa Name Colado Simão. Postal address:
20 Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center,
21 University Hospital, State University of Londrina, Av. Robert Koch 60, Londrina, Paraná,
22 Brazil. CEP: 86038-440. Telephone/Fax: +55-43-3371-2619. Email address:
23 deianame@yahoo.com.br24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

1 Abstract

2 The aim of this study was to evaluate the association of rs2232365 (-924 G>A) and rs3761548
3 (-3279 C>A) *FOXP3* variants with systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility, TGF-
4 β 1 plasma levels, autoantibodies, and LN nephritis, and SLE disease activity index (SLEDAI).
5 The study included 196 SLE female patients and 157 female controls. *FOXP3* variants were
6 determined with polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-
7 RFLP). Plasma levels of TGF- β 1 were determined using immunofluorimetric assay. The AA
8 genotype [OR: 2.650, CI 95%(1.070-6.564), p=0.035] and A allele [OR: 2.644, CI 95%(1.104-
9 6.333), p=0.029] were associated with SLE diagnosis in the -3279 C>A. The A/A haplotype
10 was associated with SLE [OR: 3.729, CI 95%(1.006-13.820), p= 0.049]. GCGC haplotype
11 patients had higher TGF- β 1 levels (p=0.012) than other haplotypes. Patients with -924 AA
12 genotype showed higher frequency of anti-dsDNA (p=0.012) and anti-U1RNP (p=0.036). The
13 A/C haplotype had higher SLEDAI score [OR: 1.119, CI 95%(1.015-1.234), p=0.024] and
14 ACAC haplotype higher frequency of anti-dsDNA [OR: 3.026, CI 95%(1.062-8.624),
15 p=0.038], anti-U1RNP [OR: 5.649, CI 95%(1.199-26.610), p=0.029] and nephritis [OR: 2.501,
16 CI 95%(1.004-6.229), p=0.049]. Our data demonstrate that the G/C haplotype provides
17 protection for SLE. While the presence of allele A of both variants could favor autoimmunity,
18 disease activity, and LN.

19 **Key words:** Systemic lupus erythematosus, TGF- β 1, *FOXP3*, rs2232365, rs3761548.

20

21

22

23

1 Introduction

2 Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease,
3 characterized by dysregulated innate and adaptive immune responses with multiple organ
4 damage [1]. Disease manifestation is very heterogeneous with different characteristics, ranging
5 from laboratory abnormalities to multiorgan failure [2]. Lupus nephritis (LN) is a severe
6 manifestation of SLE, affecting approximately 40-70% of patients and contributes substantially
7 to disease morbidity and mortality [3].

8 The etiology of SLE is not completely elucidated but involves an interaction between
9 genetic, hormonal and environmental factors [4, 5, 6]. The pathophysiology of SLE is complex
10 and characterized by the production of a large amount of autoantibodies that act against nuclear
11 cells structures and promote inflammation and tissue damage [7]. The generation of
12 autoantibodies is a result of various immunological changes, including inappropriate regulation
13 of B and T cells, loss of immune tolerance, and defective clearance of apoptotic cells and
14 immune complexes [8].

15 The regulatory $CD4^+CD25^+$ T (Treg) cells are a subset of $CD4^+$ T cells that plays a
16 crucial role in suppression of the immune response [9] by TGF- β 1 and IL-10 production [10].
17 The majority of Treg cells arise during thymic T-cells maturation and are characterized by high
18 constitutive expression of the IL-2 receptor alfa chain (CD25) and the transcription factor
19 forkhead box protein 3 (FoxP3) [11, 12]. The FoxP3 belongs to the forkhead/winged-helix
20 family of transcription factors and it is considered the master regulator of Treg cells
21 development and function [13, 14]. *FOXP3* gene is located on chromosome Xp11.23 with a
22 highly conserved forkhead DNA-binding domain. An expression of this gene is essential for
23 $CD4^+$ T cells differentiation into $CD4^+CD25^+$ Treg cells [15]. Treg cells depletion has also been
24 associated with the pathogenesis, severity, and periods of disease activity of SLE [16, 17, 18].

1 Different single nucleotide variants (SNVs) have been described in the promoter region
2 of *FOXP3*, which can affect the expression of FoxP3 and impair the Treg cells differentiation
3 and function [19]. The -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) *FOXP3* variant
4 were associated with the susceptibility and prognosis of various autoimmune diseases, such as
5 rheumatoid arthritis [20, 21], multiple sclerosis [22], and SLE [8].

6 Recently, our group demonstrated that -3279 C>A of *FOXP3* variant was associated to
7 multiple sclerosis diagnosis in female patients [22]. Regarding the other *FOXP3* variant, the -
8 924 G>A was evaluated in some autoimmunity diseases [23, 24, 25] but not in SLE. Thus, we
9 hypothesized that *FOXP3* variants could influence Treg cells function, by the inhibition of
10 TGF- β 1 production, and promoting autoantibodies and disease activity in SLE patients.
11 Therefore, the aim of this study was to evaluate the -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A
12 (rs3761548) *FOXP3* variants and their association with SLE susceptibility, TGF- β 1 plasma
13 levels, presence of autoantibodies and LN, and SLE disease activity index (SLEDAI) in SLE
14 patients.

15 **Subjects and Methods**

16 *Subjects*

17 This is a case-control study that included 353 adult participants. Among them, 196 were
18 SLE female patients, consecutively recruited during the 2016 to 2018 period of the
19 Rheumatology Outpatient Clinic of the University Hospital of Londrina-Paraná/Brazil. The
20 SLE diagnosis was established according to the American College of Rheumatology (ACR)
21 criteria [26]. The SLEDAI-2K score was used to determine disease activity and values ≥ 6 were
22 used as a parameter to classify moderate and high disease activity and < 6 to inactive and mild
23 disease activity [27, 28]. LN was reported based on medical history or by the presence of
24 proteinuria ($\geq 0.5\text{g}/24\text{h}$) and/or hematuria or pathological finding in the urine sediment, with or

1 without an increase in creatinine serum levels [29]. All patients had LN confirmed by biopsy.
2 As controls, 157 healthy female were selected from blood donors of the Regional Blood Center
3 of Londrina. Patients and controls were matched by age, ethnicity and body mass index (BMI).

4 Inclusion criteria was age between 18 and 69 years old. The exclusion criteria were the
5 presence of other inflammatory, infectious, autoimmune and neoplastic diseases. Information
6 about lifestyle, medical history, treatment and blood collection were obtained at the time of
7 inclusion in the study. All participants gave written informed consent, and the study protocol
8 was fully approved by the Institutional Research Ethics Committees of State University of
9 Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 01865212.0.0000.5231).

10 *Anthropometric measurements*

11 Body weight was measured to the nearest 0.1 kg using electronic scales, with individuals
12 wearing light clothing, but no shoes, in the morning; height was measured to the nearest 0.1 cm
13 by using a stadiometer. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

14 *Blood Collection and Immunological Biomarkers*

15 After fasting for 12 hours, venous blood samples were obtained with
16 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant and without anticoagulant. Further,
17 whole blood was centrifuged at 3000 rpm for 15 min and serum, plasma and buffy-coat were
18 separated, divided into aliquots, and stored at -80°C until use. Serum levels of complement,
19 C3 and C4 were assessed by turbidimetry (C800™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

20 Antinuclear antibodies (ANA) were quantified using indirect immunofluorescence with
21 HEp2 cells as a substrate (IFI-ANA-HEp2-IgG; VIRO-IMMUN Labor Diagnostika, GmbH,
22 Oberursel, Germany) and were considered significant when titers $\geq 1:80$. Anti-double stranded
23 DNA (Anti-dsDNA), anti-nucleosome, anti-Smith (anti-SM), anti-U1 ribonucleoprotein (anti-

1 U1RNP) antibodies were quantified by antibody enzyme immunoassay (ELISA, Orgentec
2 Diagnostika, GmbH, Germany) and were considered positive when results ≥ 20 IU/mL.

3 TGF- β 1 plasma levels were determined using microspheres immunofluorimetric assay
4 (ProcartaPlex by Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria) for Luminex platform
5 (MAGPIX™, Luminex Corp., Austin, TX, USA). All analyzes were performed according to
6 the manufacturer's instructions.

7 *Genomic DNA extraction*

8 Genomic DNA was extracted from a buffy-coat of peripheral blood cells using a resin
9 column procedure (Biopur, Biometrix Diagnostika, Curitiba, Brazil), following the
10 manufacturer's recommendations. The DNA concentration was measured with a NanoDrop
11 2000c™ spectrophotometer (ThermoScientific, Waltman, MA, USA) at 260 nm and purity was
12 assessed by measuring the 260/280 nm ratio.

13 *FOXP3 genetic variant genotyping*

14 Two SNVs in the promoter region of the *FOXP3* were genotyped: -924 G>A
15 (rs2232365) at position 49259426 and -3279 C>A (rs3761548) at position 49261784 according
16 to listed in the international database and to GenBank accession number (NG_007392.1).

17 Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)
18 analysis was carried out using peripheral blood genomic DNA to detect the rs2232365 and
19 rs3761548 SNVs, as previously reported by [30] with some modifications. For rs2232365
20 genotyping, the following primers were used: 5'-AGGAGAAGGAGTGG GCATTT-3'
21 (forward) and 5'-GTGAGTGGAGGAGCTGA GG-3' (reverse) [20]. For rs3761548
22 genotyping was performed with the following primers: 5'-GGCAGAGTTGAAATCCAAGC-
23 3' (forward) and 5'-CAACGTG TGAGAAGGCAGAA-3' (reverse) [31]. The PCR was

1 performed in a thermal cycler (Applied Biosystems Veriti™ 96-well Thermal Cycler, Life
2 Technologies, Foster City, CA, USA) with a negative control (without a DNA sample).

3 PCR products of rs2232365 [249 base pairs (bp)] were digested overnight at 37°C with
4 *Esp3I* restriction endonuclease (Anza™, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA),
5 generating two fragments of 132 bp and 117 bp corresponding to G allele, while the A allele
6 that did not undergo enzymatic cleavage and remained with 249 bp. PCR products of rs3761548
7 (155 bp) were digested with *PstI* restriction endonuclease (Anza™, Invitrogen, Life
8 Technologies, Carlsbad, CA, USA), which generated two fragments, 80 bp and 75 bp, that
9 correspond to C allele, while the A allele remained with 155 bp. All PCR-RFLP products were
10 analyzed using 10% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate.

11 *Statistical Analysis*

12 Categorical data were evaluated by chi-square (χ^2) test and expressed as absolute
13 number (n) and percentage (%). The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI)
14 were calculated. Continuous data were evaluated by Mann-Whitney test and expressed as
15 median and percentile range (25%–75%). The p value was adjusted for multiple variables (age,
16 ethnicity, BMI, and treatment) by binary logistic or multinomial regression test, when
17 appropriate. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and the estimation of pairwise linkage
18 disequilibrium (LD) were performed in Haploview software version 4.2. LD between the
19 specified SNVs was provided by describing D and r-squared value. Inference of recombination
20 sites between *FOXP3* alleles were determined using the PHASE software version 2.1.1 by
21 assigning each haplotype with maximum probability [32, 33]. All statistical analyzes were
22 performed with SPSS for Windows, version 22.0 (SPSS 31 Inc., CHIGADO, IL, USA) and
23 statistical significance was set at $p < 0.05$.

1 Results

2 Table 1 shows the baseline data of female patients with SLE. The median disease
3 duration was 10 years (4–15), the mode of ANA titers was 1:320 (1:80-1:5120) and the median
4 of SLEDAI score was 2 (1–6). Based on SLEDAI values, most of patients (81.3%) had inactive
5 disease. The median of C3 was 112.5 mg/dL (92–133) and C4 20.1 mg/dL (13.5–25.9). The
6 median of anti-nucleosome levels was 53.74 IU/mL (19.07–138.74), 58.2% had positive anti-
7 dsDNA antibodies, 23.1% had positive anti-SM antibodies and 43.2% had positive anti-U1RNP
8 antibodies. In addition, 87 (46.5%) patients had LN. Regarding treatment, 91.0% of patients
9 used corticosteroids and the median dose was 8 (5–20) mg/day. Antimalarial was used by 74.1%
10 patients, immunosuppressive by 44.4%, and mycophenolate by 22.8%.

11 The two SNVs of *FOXP3* (rs2232365/rs3761548) were genotyped in 196 SLE patients
12 and 157 healthy controls and divided into three genetic models (dominant, codominant, and
13 recessive) to assess the association with SLE susceptibility (Table 2). As expected, patients and
14 controls did not differ in age, ethnicity and BMI (data not shown). However, we control the
15 possible interference of these variables in the analysis.

16 The HWE of rs3761548 and rs2232365 in SLE patients and healthy controls was
17 assessed and genotype frequencies presented divergence from HWE (χ^2 test; $p < 0.05$), excepted
18 by rs3761548 in SLE group and rs2232365 in control group (χ^2 test; $p > 0.05$). In the -924 G>A
19 (rs2232365) variant, the frequency of the GG, GA, and AA genotypes (codominant, dominant,
20 and recessive genetic models) did not differ between SLE patients and controls ($p > 0.05$). No
21 significant associations were found in the allele frequencies (OR 1.344, 95% CI 0.808–2.237,
22 $p = 0.255$) (Table 2).

23 Regarding the -3279 C>A (rs3761548) variant, the results demonstrated that the
24 frequency of CC, CA, and AA genotypes (codominant genetic model) differed between SLE

1 patients and controls. The AA genotype was directly associated with SLE diagnosis (OR 2.650,
2 95% CI 1.070–6.564, $p=0.035$). When the dominant genetic model was evaluated in SLE and
3 controls groups, no significant association was observed in the frequency of CA+AA genotypes
4 vs CC ($p>0.05$). In the recessive genetic model, the presence of AA genotype was higher in
5 SLE patients when compared to controls, 21 (10.7%) versus 8 (5.2%) respectively (OR 2.644,
6 95% CI 1.104–6.333, $p=0.029$). Furthermore, the allelic model showed that the presence of A
7 allele was associated with SLE diagnosis (OR 2.644, 95% CI 1.104–6.333, $p=0.029$). All data
8 were adjusted by ethnicity and age.

9 Four possible haplotype combinations with rs2232365 and rs3761548 were investigated
10 in our study: A/C, A/A, G/A, and G/C. The LD between *FOXP3* rs2232365 and rs3761548
11 showed that those SNVs are not good surrogate markers for each other ($D'=0.796$; $r^2=0.265$).
12 Therefore, it is important to assess their combined effects. In the association study of *FOXP3*
13 haplotypes, the following models were analyzed: A/C dominant (A/C carriers *versus* A/A, G/C,
14 and G/A carriers), A/C recessive (ACAC *versus* A/A, G/C, and G/A carriers), A/A dominant
15 (A/A carriers *versus* A/C, G/C, and G/A carriers), G/A dominant (G/A carriers *versus* A/C,
16 A/A, and G/C carriers), G/A recessive (GAGA *versus* A/C, A/A, and G/C carriers), G/C
17 dominant (G/C carriers *versus* A/C, A/A, and G/A carriers), and G/C recessive (GCGC *versus*
18 A/C, A/A, and G/A carriers). The A/A recessive model (AAAA) was rare and was excluded
19 from the analysis. The predominant haplotype was A/C (while the less frequent haplotype was
20 A/A in our patient cohort).

21 Table 3 shows the distribution of *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A
22 (rs3761548) haplotypes among SLE patients and controls. We found an association between
23 the A/A haplotype (dominant genetic model) with SLE (OR 3.729, 95% CI 1.006–13.820,
24 $p=0.049$) adjusted by age and ethnicity. On the other hand, we found a protective effect of the
25 G/C haplotype (dominant genetic model) with SLE patients (OR 0.598, 95% CI 0.376–0.952,

1 p=0.030) adjusted by age and ethnicity.

2 In the present study, we evaluated the TGF- β 1 plasma levels in SLE patients and
3 controls. Posteriorly, we evaluated these cytokine levels according to genotype and haplotype
4 structure of *FOXP3* variants. SLE patients showed higher TGF- β 1 plasma levels than controls
5 (Figure 1A) after adjusted by age, ethnicity, and BMI ($p < 0.001$). TGF- β 1 plasma levels did not
6 differ according to -924 G>A (Figure 1B) and -3279 C>A (Figure 1C) genotypes (dominant
7 and recessive genetic models) in SLE patients, as well as among the controls (data not shown).
8 However, SLE patients with the GCGC haplotype (G/C recessive model) had higher TGF- β 1
9 plasma levels ($p = 0.012$) than other haplotypes (A/C, A/A or G/A carriers), after adjusted by
10 age, ethnicity and BMI (Figure 1D). In addition, TGF- β 1 plasma levels did not differ in SLE
11 patients according to other haplotype structures models (data not shown).

12 Furthermore, we analyzed whether the *FOXP3* variants (individually or in haplotype
13 structure) could interfere in disease activity (C3, C4 and SLEDAI), the presence of
14 autoantibodies and LN. These results are demonstrated in Table 4.

15 Patients with -924 AA genotype (recessive genetic model) showed higher frequency of
16 anti-dsDNA ($p = 0.012$) and anti-U1RNP ($p = 0.036$) antibodies, even after adjusted by age,
17 ethnicity, BMI, and treatment. However, the genotypes did not differ regarding the parameters
18 of disease activity and frequency of nephritis ($p > 0.05$). Regarding the genetic variant of *FOXP3*
19 -3279 C>A (rs3761548), there was no association with autoantibodies and disease activity.
20 However, patients with CA+AA genotype (dominant genetic model) had lower frequency of
21 nephritis ($p = 0.038$), adjusted by age, ethnicity, BMI and treatment.

22 Table 5 showed *FOXP3* haplotype structures and SLE parameters. Patients with A/C
23 haplotype (dominant genetic model) had higher SLEDAI score [OR 1.119, CI 95% (1.015–
24 1.234), $p = 0.024$] while those with the same haplotype, but in the recessive model (ACAC), had

1 higher frequency of anti-dsDNA positivity [OR 3.026, CI 95% (1.062–8.624), p=0.038], anti-
2 U1RNP positivity [OR 5.649, CI 95% (1.199–26.610), p=0.029], and nephritis [OR 2.501, CI
3 95% (1.004–6.229), p=0.049]. In addition, SLE patients with A/A haplotype (dominant genetic
4 model) had higher levels of anti-nucleosome antibodies [OR 1.004, CI 95% (1.001–1.008),
5 p=0.026].

6 **Discussion**

7 The main findings of the present study were that the AA genotype of *FOXP3* -3279
8 C>A (rs3761548) was associated with a 2.6-fold chance of developing SLE than other
9 genotypes. Also, we found an association between the *FOXP3* haplotype structures (rs2232365/
10 rs3761548) and SLE susceptibility. A/A haplotype (dominant genetic model) was associated
11 with a 3.7-fold chance to develop SLE. On the other hand, the G/C haplotype (dominant genetic
12 model) showed a protective effect of 40.0% in the susceptibility to SLE. Moreover, patients
13 with GCGC haplotype had higher levels of TGF- β 1. In addition, we demonstrated that *FOXP3*
14 variants could interfere in SLE parameters. Patients with A/C haplotype in the dominant model
15 had a higher SLEDAI score, and patients with ACAC haplotype had a 3-fold and 5.6-fold
16 chance to have anti-dsDNA and anti-U1RNP positive, respectively, and 2.5-fold higher
17 susceptibility to nephritis.

18 *FOXP3* was initially identified as a gene responsible for X-linked autoimmune diseases
19 in humans and a master regulator of the development and function of Treg [34]. Mainly
20 expressed in CD4⁺CD25⁺Treg cells, *FOXP3* encodes a transcriptional factor that is involved in
21 T cells activation and its expression is essential for driving CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg cells
22 function as suppressor T cells [35, 36]. Previous studies demonstrated that alteration of *FOXP3*
23 expression and functions could contribute to various autoimmune diseases due to a functional
24 block of Treg cells [31].

1 Previously, our group evaluated the -3279 C>A of *FOXP3* variant (rs3761548) and
2 demonstrated that the presence of the A allele increased the chance to have multiple sclerosis
3 diagnosis in female patients [22]. The presence of the A allele of *FOXP3* -3279 alters the
4 promoter region and consequently, there is a loss of binding of some transcription factors, such
5 as E47 and C-Myb, leading to defective transcription of *FOXP3* [37], and therefore, might
6 affect the function or quantity of Tregs [38]. In the present study, we demonstrated that the A
7 allele of *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548), in homozygosis or heterozygosis, confers 2.6-fold
8 chance of SLE diagnosis. Until now, only a previous study evaluated this variant in SLE
9 patients and did not find any association with SLE susceptibility [8]. Discrepancies in the
10 allelic/genotypes frequencies between studies could be explained by the heterogeneity of the
11 studied diseases, ethnicity, the limited sample size, as well as the method of genotyping and the
12 characteristics of the control group [31].

13 Regarding the -924 G>A (rs2232365), we did not find any association of this variant
14 and SLE susceptibility and clinical parameters. Although the -924 G>A *FOXP3* variant
15 (rs2232365) was evaluated in other autoimmunity diseases [23, 24, 25] this is the first study to
16 evaluate this variant in SLE patients. The G>A substitution of *FOXP3* -924 is located in a
17 putative-binding site for the transcription factor GATA-3 [39]. This transcription factor binds
18 to the promoter region of *FOXP3* to inhibits its expression only when the A allele is present.
19 To occur *FOXP3* expression, GATA-3 must be removed from the promoter region [40]. So,
20 GG carriers lose their GATA-3-binding site, enabling *FOXP3* gene transcription.

21 Genetic variants do not exert great influence by itself [41] and the analysis in
22 combination is better to understand the role of *FOXP3* variants in SLE. Thus, we investigated
23 the haplotype structures of *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548)
24 variants. The G/C haplotype (dominant genetic model) showed a protective effect of 40.0% in
25 the susceptibility to SLE. While the A/A haplotype (dominant genetic model) demonstrated to

1 be associated with SLE susceptibility and the inheritance of at least one A allele of each variant
2 increases lupus susceptibility to 3.7 times.

3 In the present study, we investigated the influence of *FOXP3* variants in TGF- β 1 plasma
4 levels, a multifunctional cytokine with immunomodulatory effects. Initially, we found higher
5 TGF- β 1 plasma levels in SLE patients compared to control group. Therefore, we hypothesized
6 that the increased TGF- β 1 plasma levels, probably, could represent an endogenous anti-
7 inflammatory response aimed at counteracting ongoing immunoinflammatory events in the
8 SLE patients. In addition, our data demonstrated that *FOXP3* -924 G>A, and -3279 C>A
9 genotypes individually were not associated with TGF- β 1 plasma levels in SLE patients.
10 However, patients with the GCGC haplotype showed higher TGF- β 1 plasma levels compared
11 to other haplotype structures and could explain the protect effect showed by G/C haplotype.
12 This is the first study to evaluate the association of these SNVs of *FOXP3* with cytokines levels
13 in SLE patients.

14 Regarding *FOXP3* variants and SLE parameters, we found that the -924 AA genotype
15 was associated with anti-dsDNA and anti-U1RNP antibodies positivity, independently of
16 extraneous factors (age, ethnicity and BMI). However, we failed to demonstrate association
17 between the -3279 C>A and autoantibodies. Our data disagreed with a previous study that
18 showed patients carrying the -3279 C allele had higher anti-dsDNA levels [8]. However, our
19 patients with the ACAC haplotype had a 3-fold chance to have anti-dsDNA positivity, 5.6-fold
20 chance to have anti-U1RNP positivity, and 2.5-fold chance to have nephritis. In addition, we
21 demonstrated that SLE patients carrying the A allele of -924 G>A, and the C allele of -3279
22 (A/C haplotype in dominant model) had higher SLEDAI score than those with other haplotype
23 combinations. Antibodies to dsDNA are usually present at high titers in SLE patients with
24 active nephritis [8]. Thus, it seems reasonable to hypothesize that the presence of the A allele,
25 from both *FOXP3* variants, could favor autoimmunity, activity disease and development of

1 nephritis. Although we identified that haplotypes of the abovementioned *FOXP3* variants were
2 associated to the antibody production and pathogenesis of lupus nephritis, the mechanisms by
3 which this may occur needs to be elucidate. More specific studies on the functional role of this
4 gene in SLE, will be necessary.

5 Some limitations of this study should be considered. This is a case-control design, which
6 does not allow inferences on causal relationship. In addition, most SLE patients had inactive or
7 mild disease activity, and parameters such as anti-dsDNA, cytokines, and complement levels,
8 fluctuate significantly during the course of SLE. This is a major limitation of such association
9 studies. However, blood samples and laboratory analyzes were performed at the time of
10 inclusion in the study, demonstrating the disease profile in that specific moment. The study also
11 has some strengths, such as the robust statistical analysis, with adjusting for some confounding
12 variables including age, ethnicity, BMI, and treatment. In addition, this is the first study to
13 investigate the *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) variants,
14 individually and haplotype, in SLE female patients.

15 In conclusion, the heritage of at least one A allele of each variant (rs2232365/
16 rs3761548) increases SLE susceptibility while patients with A/C haplotype in the dominant
17 model had a higher SLEDAI score and patients with ACAC haplotype structure are associated
18 with anti-dsDNA and anti-U1RNP antibodies, and higher susceptibility to nephritis.
19 Furthermore, patients with the GCGC haplotype showed higher TGF- β 1 plasma levels and G/C
20 haplotype in the dominant model showed a protective effect in SLE susceptibility.

21 Our data demonstrate that the genetic variants of *FOXP3* are associated with SLE
22 susceptibility. The G/C haplotype provides protection for SLE, possibly by increasing TGF- β
23 levels. While the presence of allele A of both variants, could favor autoimmunity, disease
24 activity and presence of LN. The impact of these genetic variants in the immunity imbalance

1 and their relation to autoantibodies and disease activity lead to significant information regarding
2 the role of *FOXP3* in SLE pathophysiology.

3

4 **Additional Information**

5 **Conflict of interest**

6 The authors declare that they have no conflict of interest.

7 **Ethical approval**

8 This study was conducted after approval by the Institutional Research Ethics
9 Committees of University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 01865212.0.0000.5231). All
10 procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the
11 ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964
12 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

13 **Author's contributions**

14 **Conception and research design:** Andréa Name Colado Simão, Tamires Flauzino;
15 **Manuscript writing and discussion of results:** Andréa Name Colado Simão; Edna Maria
16 Vissoci Reiche; Nicole Perugini Stadtlober; Tamires Flauzino, Isaias Dichi; **Data collection:**
17 Nicole Perugini Stadtlober, Lorena Flor da Rosa Franchi Santos, Tatiana Mayumi Veiga
18 Iriyoda, Neide Tomimura Costa which contributed equally; **Laboratory analysis:** Nicole
19 Perugini Stadtlober, Tamires Flauzino, Lorena Flor da Rosa Franchi Santos, Marcell Alysson
20 Batisti Lozovoy; **Statistical analysis:** Andréa Name Colado Simão, Tamires Flauzino. All
21 authors have read and approved the final manuscript.

22

1 Reference

- 2 1. Tsokos, G.C., Lo, M. S., Reis, P. C., Sullivan, K.E. New insights into the
3 immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 716-730
4 (2016).
- 5 2. Arriens, C., Wren, J.D., Munroe, M.E., Mohan, C. Systemic lupus erythematosus
6 biomarkers: the challenging quest. *Rheumatology* 56, i32-i45 (2017).
- 7 3. Mohan, C., Putterman, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and
8 lupus nephritis. *Nat. Rev. Nephrol.* 11, 329–341 (2015).
- 9 4. Costenbader, K.H., Feskanich ,D., Stampfer, M.J., Karlson, E.W. Reproductive and
10 menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum.*
11 56,1251-62 (2007).
- 12 5. Batu, E.D. Monogenic systemic lupus erythematosus: insights in pathophysiology.
13 *Rheumatol. Int.* 38, 1763-1775 (2018).
- 14 6. Jeong, D.Y. et al. Genetic variation and systemic lupus erythematosus: A field synopsis
15 and systematic meta-analysis. *Autoimmun. Rev.* 17, 553-566 (2018).
- 16 7. Zharkova, O. et al. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus
17 erythematosus. *Rheumatology.* 56, i55-i66 (2017).
- 18 8. Lin, Y.C. et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in FOXP3 gene with
19 systemic lupus erythematosus susceptibility: a case-control study. *Lupus.* 20, 137-43
20 (2011).
- 21 9. Takahashi, T. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally
22 anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their
23 anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10, 1969-80 (1998).
- 24 10. Ohl, K., Tenbrock, K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur. J.*
25 *Immunol.* 45, 344-55 (2015).

- 1 11. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. Immunologic self-tolerance
2 maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown
3 of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*
4 155:1151-64 (1995).
- 5 12. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A. FOXP3+ regulatory T cells in
6 the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 490-500 (2010).
- 7 13. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. Regulatory T cells and immune
8 tolerance. *Cell.* 133, 775–787 (2008).
- 9 14. Devaud, C., Darcy, P.K., Kershaw, M.H. Foxp3 expression in T regulatory cells and other
10 cell lineages. *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 869-76 (2014).
- 11 15. Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the
12 transcription factor Foxp3. *Science.* 299, 1057-61 (2003).
- 13 16. Liu, M.F., Wang, C.R., Fung, L.L., Wu, C.R. Decreased CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral
14 blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 59, 198-202
15 (2004).
- 16 17. Miyara M. et al. Global Natural Regulatory T Cell Depletion in Active Systemic Lupus
17 Erythematosus. *J. Immunol.* 175, 8392-400 (2005).
- 18 18. Mellor-Pita, S. et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus
19 erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 553–554 (2006).
- 20 19. Cheng, Z., Guo, Y., Ming, L. Functional Foxp3 polymorphisms and the susceptibility to
21 cancer. *Medicine.* 97, e11927 (2018).
- 22 20. Paradowska-Gorycka, A., Jurkowska, M., Felis-Giemza, A., Romanowska-Próchnicka, K.,
23 Manczak, M., Maslinski, S., Olesinska, M. Genetic Polymorphisms of Foxp3 in Patients
24 with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 42, 170-80 (2015).

- 1 21. Hashemi, V. et al. Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells
2 and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in Iranian population. *Immunol.*
3 *Letters.* 204, 16–22 (2018).
- 4 22. Flauzino, T. et al. The rs3761548 FOXP3 variant is associated with multiple sclerosis and
5 transforming growth factor β 1 levels in female patients. *Inflamm. Res.* 68, 933-943 (2019).
- 6 23. Song, G.G., Choi, S.J., Ji, J.D., Lee, Y.H. Association between interleukin-18
7 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 40,
8 2581-7 (2013).
- 9 24. Eftekharian, M. M. et al. Single nucleotide polymorphisms in the FOXP3 gene are
10 associated with increased risk of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum. Antibodies.*
11 24, 85-90 (2017).
- 12 25. Cekin, N. et al. FOXP3 rs3761548 polymorphism is associated with knee osteoarthritis in a
13 Turkish population. *Int. J. Rheum. Dis.* 21, 1779-1786 (2018).
- 14 26. Petri. M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating
15 Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism.* 64,
16 2677–2686 (2012).
- 17 27. Gladman, D. D., Ibanez, D., Urowitz. Systemic lupus erythematosus disease activity index.
18 *J. Rheumatol.* 29 (2), 288-291 (2002).
- 19 28. Petri, M., Genovese, M., Engle, E., Hochberg, M. Definition, incidence, and clinical
20 description of flare in systemic lupus erythematosus: a prospective cohort study. *Arthritis*
21 *Rheumatism* 34:937–944 (1991).
- 22 29. Sui, M. et al. Simultaneous positivity for anti-DNA, anti-nucleosome and anti-histone
23 antibodies is a marker for more severe lupus nephritis. *J. Clin. Immunol.* 33, 378-387
24 (2013).

- 1 30. Banin Hirata, B. K. et al. *FOXP3* allelic variants and haplotypes structures are associated
2 with aggressive breast cancer subtypes. *Dis. Markers*. 2017, 1-8 (2017).
- 3 31. He, Y., Na, H., Li, Y., Qiu, Z., & Li, W. FoxP3 rs3761548 polymorphism predicts
4 autoimmune disease susceptibility: A meta-analysis. *Hum. Immu.* 74, 1665–1671 (2013).
- 5 32. Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P. A new statistical method for haplotype
6 reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 978-89 (2001).
- 7 33. Stephens, M., Scheet, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype
8 inference and missing-data imputation. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 449-62 (2005).
- 9 34. Bennett, C.L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-
10 linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21 (2001).
- 11 35. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and
12 function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunol.* 4,330–336 (2003).
- 13 36. Zhang, L., Zhao, Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T
14 cells: multiple pathways on the road. *J. Cell Physiol.* 211, 590–7 (2007).
- 15 37. Shen, Z. et al. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in
16 psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 226–241 (2010).
- 17 38. Hoogendoorn, B. et al. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum. Mol.*
18 *Genet.* 12, 2249–2254 (2003).
- 19 39. Wu, Z. et al. Association between functional polymorphisms of Foxp3 gene and the
20 occurrence of unexplained recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population.
21 *Clin. Develop. Immunol.* 2012, 1-7 (2012).
- 22 40. Maruyama, T. et al. Control of the differentiation of regulatory T cells and TH17 cells by
23 the DNA-binding inhibitor Id3. *Nat. Immunol.* 12, 86–95 (2011).

- 1 41. Terry, C.F., Loukaci, V., Green, F.R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on
2 interleukin 6 transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 275, 18138–44 (2000).
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24

Table 1 Clinical and laboratory parameters of patients with systemic lupus erythematosus (SLE).

| Characteristics | N=196 |
|--------------------------|-----------------------|
| Disease duration (years) | 10 (4–15) |
| SLEDAI | 2 (1–6) |
| ≥ 6 | 36 (18.7) |
| < 6 | 157 (81.3) |
| ANA (titer) | 1:320 (1:80 – 1:5120) |
| C3 (mg/dL) | 112.5 (92.0–133.0) |
| C4 (mg/dL) | 20.1 (13.5–25.9) |
| Anti-nucleosome (IU/mL) | 53.74 (19.07–138.74) |
| Anti-dsDNA (IU/mL) | 28.44 (8.00–72.27) |
| Positive | 107 (58.2) |
| Negative | 77 (41.8) |
| Anti-SM (IU/mL) | 6.43 (3.79–17.63) |
| Positive | 30 (23.1) |
| Negative | 100 (76.9) |
| Anti-U1RNP (IU/mL) | 13.09 (5.21–83.75) |
| Positive | 54 (43.2) |
| Negative | 71 (56.8) |
| Lupus nephritis | 87 (46.5) |
| Treatment | |
| Prednisone | 172 (91) |
| Prednisone (mg/day) | 8 (5–20) |
| Antimalarials | 140 (74.1) |
| Mycophenolate | 43 (22.8) |
| Immunosuppressive | 84 (44.4) |

Data were expressed by median and percentile (25–75) or absolute number (n) and percentage (%). ANA: semi quantitative values expressed in titers and analyzed as mode. SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; ANA: antinuclear antibodies; C3: complement 3; C4: complement 4; Anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA; Anti-SM: anti-Smith; Anti-U1RNP: anti-U1 ribonucleoprotein.

Table 2 Distribution of *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) genotypes and allelic frequencies among patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls.

| | | Genetic model | Controls (n=157 ¹) | SLE (n=193 ²) | OR (95% CI) | p-value* |
|---------------------|------------|---------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------|
| rs2232365 | | | | | | |
| -924 G>A | | | | | | |
| | Allelic | | | | | |
| | G | | 169 (53.8) | 203 (52.6) | Reference | |
| | A | | 145 (46.2) | 183 (47.4) | 1.344 (0.808–2.237) | 0.255 |
| | Codominant | | | | | |
| | GG | | 42 (26.8) | 45 (23.3) | Reference | |
| | GA | | 85 (54.1) | 113 (58.5) | 1.379 (0.812–2.342) | 0.234 |
| | AA | | 30 (19.1) | 35 (18.1) | 1.243 (0.635–2.434) | 0.525 |
| | Dominant | | | | | |
| | GG | | 42 (26.8) | 45 (23.3) | Reference | |
| | GA+AA | | 115 (73.2) | 148 (76.7) | 1.317 (0.792–2.190) | 0.288 |
| | Recessive | | | | | |
| | GG+GA | | 127 (80.9) | 158 (81.9) | Reference | |
| | AA | | 30 (19.1) | 35 (18.1) | 0.993 (0.567–1.739) | 0.981 |
| | | Genetic model | Controls (n=155 ¹) | SLE (n=196 ²) | OR (95% CI) | p-value* |
| rs3761548 | | | | | | |
| -3279 C>A | | | | | | |
| | Allelic | | | | | |
| | C | | 217 (70.0) | 260 (66.3) | Reference | |
| | A | | 93 (30.0) | 132 (33.7) | 2.644 (1.104–6.333) | 0.029 |
| | Codominant | | | | | |
| | CC | | 70 (45.2) | 85 (43.4) | Reference | |
| | CA | | 77 (49.7) | 90 (45.9) | 1.004 (0.632–1.596) | 0.986 |
| | AA | | 8 (5.2) | 21 (10.7) | 2.650 (1.070–6.564) | 0.035 |
| | Dominant | | | | | |
| | CC | | 70 (45.2) | 85 (43.4) | Reference | |
| | CA+AA | | 85 (54.8) | 111 (56.6) | 1.150 (0.735–1.798) | 0.540 |
| | Recessive | | | | | |
| | CC+CA | | 147 (94.8) | 175 (89.3) | Reference | |
| | AA | | 8 (5.2) | 21 (10.7) | 2.644 (1.104–6.333) | 0.029 |

χ^2 : results of analyses of contingency tables. Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%). Bold values represent statistically significant values. *Adjusted by age and ethnicity.

¹ Hardy-Weinberg equilibrium χ^2 : rs3761548=5.18, p<0.05; rs2232365=1.25, p>0.05

² Hardy-Weinberg equilibrium χ^2 : rs3761548=0.15, p>0.05; rs2232365=5.85, p<0.05

Table 3 Distribution of *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) haplotype models among patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls.

| Haplotypes (rs2232365/rs3761548) | Controls (n=157) | SLE (n=193) | OR (95% CI) | <i>p</i> -value* |
|-------------------------------------|---------------------|----------------|----------------------|------------------|
| A/C dominant | 111 (71.6) | 140 (72.5) | 0.890 (0.546–1.453) | 0.642 |
| A/C recessive | 29 (18.7) | 31 (16.1) | 0.889 (0.499–1.584) | 0.690 |
| A/A dominant | 3 (1.9) | 12 (6.2) | 3.729 (1.006–13.820) | 0.049 |
| G/A dominant | 84 (54.2) | 106 (54.9) | 1.115 (0.713–1.742) | 0.633 |
| G/A recessive | 6 (3.9) | 13 (6.7) | 2.120 (0.755–5.951) | 0.154 |
| G/C dominant | 67 (43.2) | 70 (36.3) | 0.598 (0.376–0.952) | 0.030 |
| G/C recessive | 10 (6.5) | 14 (7.3) | 1.004 (0.414–2.434) | 0.993 |

Bold values represent statistically significant values: OR (odds ratio) and CI (confidence interval) 95%.
 *Adjusted by age and ethnicity. Haplotype models: A/C dominant (A/C carriers versus A/A, G/C, and G/A carriers), A/C recessive (ACAC versus A/A, G/C, and G/A carriers), A/A dominant (A/A carriers versus A/C, G/A, and G/C carriers), G/A dominant (G/A carriers versus A/C, A/A, and G/C carriers), G/A recessive (GAGA versus A/C, A/A, and G/C carriers), G/C dominant (G/C carriers versus A/C, A/A, and G/A carriers), and G/C recessive (GCGC carriers versus A/C, A/A, and G/A carriers).

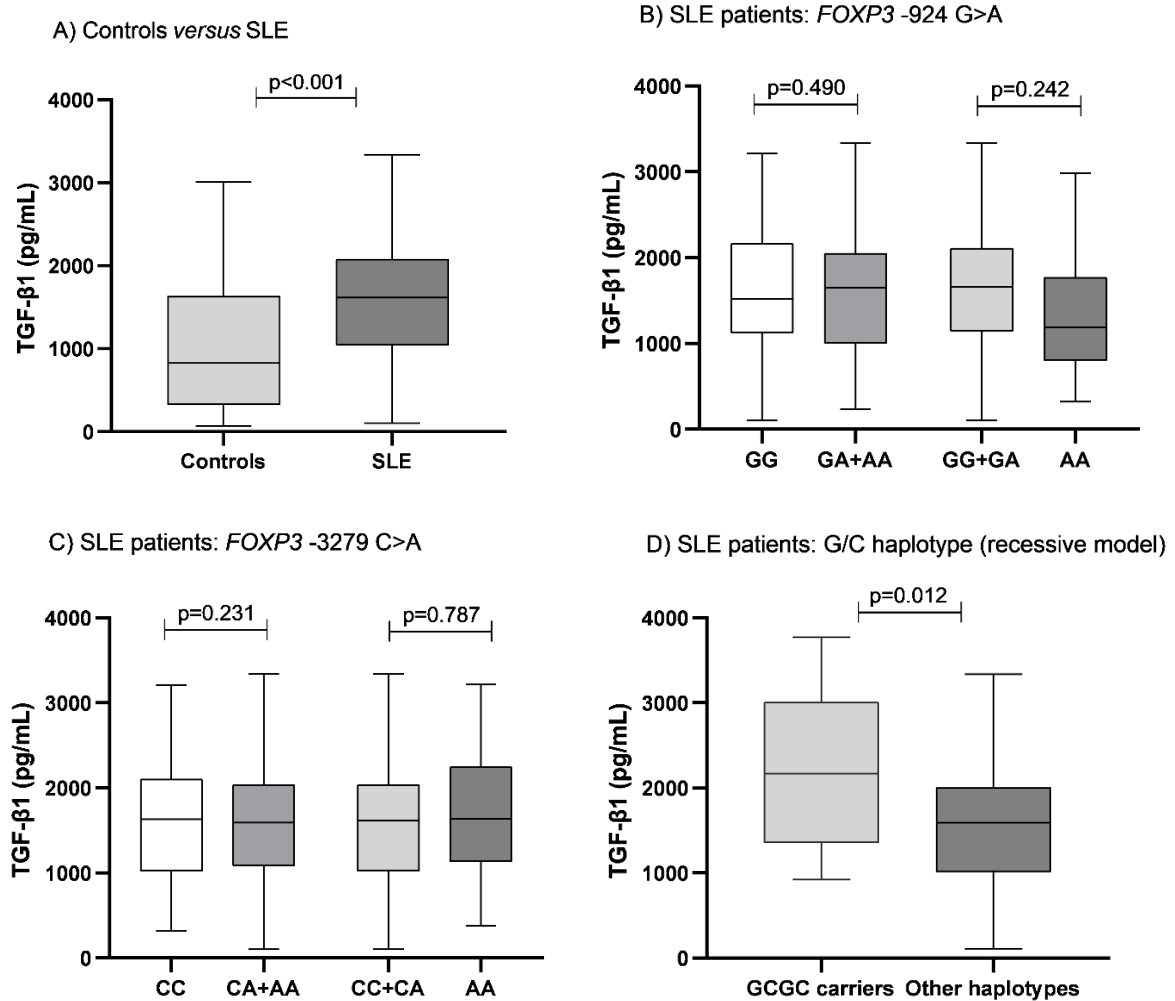


Figure 1. A) Transforming growth factor (TGF)- β 1 plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls; B) TGF- β 1 plasma levels according to -924 G>A *FOXP3* variant (dominant and recessive model, respectively) in SLE patients; C) TGF- β 1 plasma levels according to -3279 C>A *FOXP3* variant (dominant and recessive model, respectively) in SLE patients; D) TGF- β 1 plasma levels according to the G/C recessive haplotype model in SLE patients. Results expressed as median and percentile (25–75). p-value adjusted by age, ethnicity, and body mass index. G/C recessive haplotype model: GCGC carriers versus other haplotypes (A/C, A/A, and G/A carriers). Controls (n=157), SLE (n=196), SLE *FOXP3* -924 G>A: GG (n=45), GA+AA (n=148), GG+GA (n=158), AA (n=35), SLE *FOXP3* -3279 C>A: CC (n=85), CA+AA (n=111), CC+AA (n=175), AA (n=21), SLE GCGC haplotype (n=14), other haplotypes (n=179).

Table 4 Clinical and laboratory parameters of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) according to *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) genotypes in dominant and recessive models.

| SLE parameters | -924 G>A (dominant model) | | -924 G>A (recessive model) | | -3279 C>A (dominant model) | | -3279 C>A (recessive model) | |
|-------------------------|---------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| | GG | GA+AA | GG+GA | AA | CC | CA+AA | CC+CA | AA |
| C3 (mg/dL) | 115 (93–136) | 111 (92–130) | 115 (97–135) | 106 (87–122) | 107 (90–126) | 116 (98–135) | 112 (92–132) | 115 (99–135) |
| C4 (mg/dL) | 20.8 (13.4–26.2) | 19.8 (13.6–25.7) | 20.5 (13.5–26.0) | 18.4 (13.3–23.2) | 20.3 (14.1–27.7) | 19.7 (13.4–25.8) | 20.3 (13.6–25.8) | 18.0 (13.5–26.5) |
| SLEDAI | 2 (0–5) | 4 (2–6) | 3 (0–6) | 2 (2–6) | 2 (2–6) | 2 (0–6) | 4 (2–6) | 2 (0–3) |
| SLEDAI ≥ 6 | 6 (13.6) | 30 (20.5) | 30 (19.2) | 6 (17.6) | 13 (15.7) | 23 (20.9) | 33 (19.2) | 3 (14.3) |
| Anti-nucleosome (IU/mL) | 38.1 (15.7–125.0) | 58.3 (24.5–141.0) | 52.4 (19.4–133.0) | 77.2 (24.5–176.0) | 65.7 (20.2–159.0) | 44.8 (17.8–131.0) | 51.3 (18.6–132.0) | 97.0 (30.6–315.0) |
| Anti-dsDNA Positive | 20 (47.6) | 86 (61.4) | 81 (54.0) | 25 (78.1)* | 48 (61.5) | 59 (55.7) | 96 (58.5) | 11 (55.0) |
| Anti-SM Positive | 5 (16.1) | 25 (25.3) | 23 (20.9) | 7 (35.0) | 17 (31.5) | 13 (17.1) | 26 (22.4) | 4 (28.6) |
| Anti-U1RNP Positive | 14 (50.0) | 57 (58.8) | 43(40.6) | 11(57.9)* | 26 (49.1) | 28 (38.9) | 49 (43.4) | 5 (41.7) |
| Lupus nephritis | 21 (48.8) | 64 (45.4) | 18 (54.5) | 67 (44.4) | 45 (56.2) | 42 (39.3)* | 78 (46.7) | 9 (45.0) |

Data were expressed by median and percentile (25–75) or absolute number (n) and percentage (%). *p<0.05, adjusted by age, ethnicity, body mass index and treatment. C3: complement 3; C4: complement 4; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; Anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA; Anti-SM; anti-Smith; Anti-U1RNP: anti-U1 ribonucleoprotein.

Table 5 Clinical and laboratory parameters of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) according to *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) haplotype models.

| SLE parameters | A/C dominant | A/C recessive | A/A dominant | G/A dominant | G/A recessive | G/C dominant | G/C recessive |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | p-value | p-value | p-value | p-value | p-value | p-value | p-value |
| C3 (mg/dL) | 0.557 | 0.749 | 0.717 | 0.390 | 0.922 | 0.496 | 0.607 |
| C4 (mg/dL) | 0.896 | 0.599 | 0.640 | 0.503 | 0.964 | 0.164 | 0.819 |
| SLEDAI | 0.024¹ | 0.439 | 0.954 | 0.339 | 0.211 | 0.583 | 0.344 |
| SLEDAI \geq 6 | 0.297 | 0.138 | 0.111 | 0.908 | 0.680 | 0.731 | 0.235 |
| Anti-nucleosome (IU/mL) | 0.312 | 0.854 | 0.026⁵ | 0.513 | 0.776 | 0.433 | 0.939 |
| Anti-dsDNA Positive | 0.119 | 0.038² | 0.507 | 0.097 | 0.620 | 0.179 | 0.924 |
| Anti-SM Positive | 0.662 | 0.080 | 0.324 | 0.082 | 0.547 | 0.935 | 0.855 |
| Anti-U1RNP Positive | 0.189 | 0.029³ | 0.320 | 0.346 | 0.251 | 0.907 | 0.245 |
| Lupus nephritis | 0.251 | 0.049⁴ | 0.062 | 0.161 | 0.750 | 0.381 | 0.301 |

Bold values represent statistically significant values. *p-value adjusted by age, ethnicity, body mass index, and treatment. C3: complement 3; C4: complement 4; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; Anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA; Anti-SM; anti-Smith; Anti-U1RNP: anti-U1 ribonucleoprotein. Haplotype models: A/C dominant (A/C carriers versus A/A, G/C, and G/A carriers), A/C recessive (ACAC versus A/A, G/C, and G/A carriers), A/A dominant (A/A carriers versus A/C, G/A, and G/C carriers), G/A dominant (G/A carriers versus A/C, A/A, and G/C carriers), G/A recessive (GAGA versus A/C, A/A, and G/C carriers), G/C dominant (G/C carriers versus A/C, A/A, and G/A carriers), and G/C recessive (GCGC carriers versus A/C, A/A, and G/A carriers). ¹OR 1.119, CI 95% (1.015–1.234), p=0.024; ²OR 3.026, CI 95% (1.062–8.624), p=0.038; ³OR 5.649, CI 95% (1.199–26.610), p=0.029; ⁴OR 2.501, CI 95% (1.004–6.229), p=0.049; ⁵OR 1.004, CI 95% (1.001–1.008), p=0.026.

1 5.2 ARTIGO 2

2 ***TGFBI* +869 T>C (rs1800470) variant is independently associated with susceptibility**
3 **and disease activity in systemic lupus erythematosus**4
5
6
7 Nicole Perugini Stadtlober¹, Tamires Flauzino¹, Lorena Flor da Rosa Franchi Santos¹, Tatiana
8 Mayumi Veiga Iriyoda², Neide Tomimura Costa³, Marcell Alysson Batisti Lozovoy⁴, Edna
9 Maria Vissoci Reiche⁴, Andréa Name Colado Simão⁴.

10

11

12

13 ^{1.} Laboratory of Research in Applied Immunology, State University of Londrina, Londrina,
14 PR, Brazil15 ^{2.} Department of Rheumatology, Pontifical Catholic University of Paraná (PUC/PR),
16 Londrina, PR, Brazil17 ^{3.} Department of Rheumatology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil18 ^{4.} Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Laboratory of Research in
19 Applied Immunology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

20

21

22

23

24

25 * Corresponding author: Andréa Name Colado Simão.

26 Postal address: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Rua Robert
27 Koch, n 60. University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440. Tel.: +55-43-
28 3371-2321; Fax: +55-43-3371-2619; email address: deianame@yahoo.com.br

29

30

31

32

33

34

35

1 Abstract

2

3 **Background:** The transforming growing factor-beta 1 (TGF- β 1) is an immunoregulatory
4 cytokine with immunosuppressive functions. *TGFBI* genetic variants could reduce TGF- β 1
5 levels and predispose to autoimmune disease. **Objective:** evaluate the association of the +869
6 T>C (rs1800470) and -509 C>T (rs1800469) *TGFBI* variants, individually or in haplotypes
7 structure, with susceptibility, autoantibodies, disease activity, and TGF- β 1 plasma levels in
8 systemic lupus erythematosus (SLE). **Subjects and Methods:** The study included 203 patients
9 with SLE and 165 healthy controls. *TGFBI* variants were determined by real-time polymerase
10 chain reaction (qPCR). Plasma levels of TGF- β 1 were determined using immunofluorimetric
11 assay. **Results:** The *TGFBI* +869 CC genotype was associated with SLE susceptibility (OR:
12 1.710, 95%CI: 1.020–2.866, p=0.042) and with reduction of C4 (p=0.040) and TGF- β 1 plasma
13 levels (p=0.044). In addition, patients with *TGFBI* +869 TC and CC genotypes and with anti-
14 dsDNA had lower TGF- β 1 levels than patients with TT (p=0.004), but not in patients without
15 anti-dsDNA. Regarding the *TGFBI* -509, the TT genotype was associated with reduced levels
16 of C4 (p=0.032). There was no association between haplotypes and clinical and laboratory
17 parameters. **Conclusion:** Our data demonstrated that the *TGFBI* +896 C>T variant can be used
18 as a genetic marker for SLE susceptibility and both variants are predictors of disease activity.
19 In addition, this is the first study to demonstrate that TGF- β 1 plasma levels can be modulated
20 by the interaction between *TGFBI* +869 C allele, in homozygosity, or heterozygosity, and the
21 presence of anti-dsDNA.

22

23 **Key-words:** Systemic lupus erythematosus, transforming growth factor-beta 1, rs1800470,
24 rs1800469, SLEDAI

25

26

1 Introduction

2 The systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disease represented
3 by alterations in innate and adaptive immune responses leading to inflammation and tissue
4 damage (Tsokos et al., 2016). SLE can affect multiple organs and systems, with clinical
5 manifestations of different spectrum of severity (Kuhn et al., 2015). Several predisposing
6 factors, including genetic (Baltus et al., 2016; Delongui et al., 2017; Guimarães et al., 2017),
7 environmental (Parks et al., 2017; Pedro et al., 2019), and hormonal factors (Costenbader et
8 al., 2007) have been involved in the etiology of SLE. However, the exact mechanism is still
9 unclear.

10 The pathophysiology of SLE is characterized by a set of immunological reactions,
11 resulting in hyperactivity of B and T cells, complement system activation, increased numbers
12 of autoantibodies, and immune complex deposition (Mok, 2003). Cytokines also play an
13 important role in the pathophysiology through the modulation of immune responses and
14 inflammatory reactions (Tsao, 2004; Yap; Lai, 2013). Transforming growth factor- β (TGF- β)
15 superfamily is a major immunoregulatory cytokine with important immunosuppressive
16 functions (Caserta et al., 2004). There are three isoforms of TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF-
17 β 3) in humans, with TGF- β 1 being the most abundant isoform found in the circulation (Grainger
18 et al., 2000). TGF- β 1 maintains the immune tolerance by the regulation of lymphocyte
19 proliferation, differentiation, and survival (Blobe; Schiemann; Lodish, 2000). Previous studies
20 have found that SLE patients have lower levels of TGF- β 1 than healthy controls (Ohtsuka et
21 al., 1998; Becker-Merok et al., 2010). In addition, *TGFB1* knockout mice developed an SLE-
22 like disorder with a variety of autoantibodies and Sjogren's syndrome-like lymphoproliferative
23 disease (Dang et al., 1995).

1 Growing evidence has demonstrated that genetic variants in the coding and promoting
2 regions of cytokine genes could affect the cytokine production and, consequently may influence
3 disease susceptibility and clinical manifestations (Rezaei et al., 2015; Paradowska-Gorycka et
4 al., 2019). In addition, it has been evaluated that *TGFBI* genetic variants could reduce TGF- β 1
5 levels and predispose to autoimmune disease, including SLE. However, the data are still scarce
6 and controversial (Caserta et al., 2004; Lu et al., 2004; Wang et al., 2007; Sayed et al., 2014).
7 Thus, the study aimed to evaluate the association of the +869 T>C (rs1800470) and -509 C>T
8 (rs1800469) *TGFBI* variants, individually or in haplotype structure, with susceptibility,
9 autoantibodies, disease activity, and TGF- β 1 plasma levels in SLE patients.

10 **Subjects and Methods**

11 *Patients and Controls*

12 This is a case-control study that included 368 adult subjects of both sexes. Of them, 203
13 patients with SLE were recruited from the Rheumatology Outpatient Clinic of the University
14 Hospital of Londrina-Paraná/Brazil. The SLE diagnosis was established according to the
15 American College of Rheumatology (ACR) criteria (Petri et al., 2012). Disease activity was
16 determined by the SLE disease activity index (SLEDAI-2K) and values ≥ 6 were used as a
17 parameter to classify moderate and high disease activity and < 6 to inactive and mild disease
18 activity (Petri et al., 1991; Gladman; Ibanez; Urowitz, 2002). As controls, 165 healthy
19 individuals were selected from blood donors of the Regional Blood Center of Londrina-
20 Paraná/Brazil. None of the participants in the study presented other inflammatory, infectious,
21 autoimmune, and neoplastic diseases.

22 Information about lifestyle, medical history, and SLE medication was obtained at clinical
23 evaluation using a standard questionnaire at the individual's admission. Body mass index (BMI)
24 was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. All participants gave written

1 informed consent, and the study protocol was fully approved by the Research Ethics
2 Committees of the State University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE:
3 01865212.0.0000.5231).

4 *Blood Collection and Immunological Biomarkers*

5 After fasting for 12 hours, venous blood samples were collected with and without
6 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant and centrifuged at 3000 rpm for 15
7 min. Serum, plasma, and buffy-coat were separated, aliquoted, and stored at -80°C until they
8 are used in the analyzes.

9 C3 and C4 serum levels were determined by turbidimetry (C800TM, Abbott Laboratory,
10 Abbott Park, IL, USA). Anti-double stranded DNA (Anti-dsDNA), anti-nucleosome, anti-
11 Smith (anti-SM), anti-U1 ribonucleoprotein (anti-U1RNP) antibodies were quantified by
12 antibody enzyme immunoassay (ELISA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Germany), and the
13 result ≥ 20 IU/mL were considered positive.

14 TGF- β 1 plasma levels were determined using microspheres immunofluorimetric assay
15 (ProcartaPlex by Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria) for the Luminex platform
16 (MAGPIXTM, Luminex Corp., Austin, TX, USA). All the analyzes were performed according
17 to the manufacturer's instructions.

18 *Genomic DNA Extraction and TGFBI Genetic Variants Genotyping*

19 Genomic DNA was extracted from a buffy-coat of peripheral blood cells using a resin
20 column procedure for *TGFBI* genotyping (Biopur, Biometrix Diagnostika, Curitiba, Brazil),
21 following the manufacturer's instructions. DNA concentration was measured using a NanoDrop
22 2000cTM spectrophotometer (ThermoScientific, Waltman, MA, USA) at 260nm, and purity was
23 assessed by 260/280nm ratio.

1 Two single nucleotide variants (SNVs) in the regulatory region of the *TGFBI* gene were
2 genotyped: +869 T>C (rs1800470) at position 41353016 and -509 C>T (rs1800469) at position
3 41354391, according to listed in the international database GenBank. The rs1800470 and
4 rs1800469 *TGFBI* variants were genotyped by the TaqMan allelic discrimination assay on real-
5 time polymerase chain reaction (qPCR) system (StepOne, Applied Biosystems by Life
6 Technologies, Carlsbad, CA, USA). The reaction was performed using 0.25 μ L TaqMan SNP
7 Genotyping Assay 40x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) containing two sequence-
8 specific primers and two allele-specific TaqMan[®] MGB probes with a reporter dye at its 5' end
9 (VIC[®] or FAM[™]), 5 μ L TaqMan Universal Genotyping Master Mix (Applied Biosystems,
10 Foster City, CA, USA), and 5 ng of genomic DNA. With a final reaction volume of 10 μ L.

11 *Statistical Analysis*

12 Categorical data were evaluated by the chi-square (χ^2) test and expressed as absolute
13 number (n) and percentage (%). Continuous data were evaluated by the Mann-Whitney test and
14 expressed as median and percentile range (25%–75%). The p-value was adjusted for extraneous
15 variables (age, sex, ethnicity, and BMI) by binary logistic regression test.

16 The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were calculated. Hardy-
17 Weinberg equilibrium (HWE) and the estimation of pairwise linkage disequilibrium (LD) were
18 performed in Haploview software version 4.2. LD between the specified SNVs was provided
19 by describing D and r-squared value. Inference of recombination sites between *TGFBI* alleles
20 were determined using the PHASE software version 2.1.1 by assigning each haplotype with
21 maximum probability (Stephens; Smith; Donnelly, 2001; Stephens; Scheet; 2005). *TGFBI*
22 haplotype analysis was performed in the SNPStats program (Solé et al., 2006). For all statistical
23 tests $p < 0.05$ was considered for the significance level and all statistical analyses were performed
24 using IBM SPSS windows version 24.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

1 **Results**

2 **Table 1** shows socio-demographic, clinical and laboratory data in SLE patients and
3 controls. Patients and controls did not differ in sex ($p=0.456$) and ethnicity ($p=0.061$). However,
4 SLE patients were older ($p=0.008$) and had a higher BMI ($p<0.001$) than controls. Thus, we
5 have adjusted the results for possible effects of age and BMI in multivariate analyses. The
6 median disease duration was 10 years (4-15) and only 54 (27.0%) patients had active disease
7 (SLEDAI \geq 6). Most SLE patients had positive anti-dsDNA (58.9%), corticotherapy was the
8 most common treatment (88%), followed by antimalarials (74.5%).

9 **Table 2** shows the distribution of genotypes and allele frequencies of *TGFBI* +869 T>C
10 and *TGFBI* -509 C>T variants, obtained among SLE patients and healthy controls.
11 Associations with SLE susceptibility were tested in five different genetic models: the allelic
12 model, codominant model, dominant model, recessive model, and over-dominant model. The
13 HWE of +869 T>C and -509 C>T in SLE patients and healthy controls were consistent with
14 those expected ($p>0.05$).

15 Regarding *TGFBI* +869 T>C variant, the frequency of CC genotype (in the recessive
16 genetic model) was higher in SLE patients than the control group (OR 1.710, 95% CI 1.020 -
17 2.866, $p=0.042$). However, the frequency of TT, TC, and CC genotypes did not differ in other
18 models. In addition, no difference was found in allele frequencies between the groups (OR
19 1.228, 95% CI 0.911-1.657, $p=0.178$). In the *TGFBI* -509 C>T variant, no difference was found
20 in the allele and genotype frequency between SLE patients and controls. All analyzes were
21 adjusted by age, sex, and ethnicity (**Table 2**).

22 Four possible haplotype combinations from *TGFBI* variants (rs1800470/rs1800469)
23 were investigated in our study: T/C, C/T, C/C, and T/T. The LD between +869 T>C and -509
24 C>T *TGFBI* variants was $D'=0.985$, $r^2=0.642$. In our patient cohort, the predominant haplotype

1 was T/C (50.6%), while the less frequent haplotype was T/T (<1%). The distribution of *TGFBI*
2 variant haplotypes did not differ between SLE patients and controls, controlled by age, sex, and
3 ethnicity (**Table 3**).

4 In **Table 4**, we evaluated whether *TGFBI* variants could interfere in disease activity
5 laboratory parameters, SLEDAI score, and autoantibodies in SLE patients. Regarding *TGFBI*
6 +869 T>C variant, we found that patients carrying the CC genotype (in the recessive genetic
7 model) had lower levels of C4 than those carrying the TT+TC genotypes (p=0.040). However,
8 the autoantibodies status, SLEDAI, and C3 levels were not associated with *TGFBI* +869
9 genetic variant. The use of immunosuppressive drugs differs between the SLE patients, so, all
10 the results were adjusted by age, sex, ethnicity, BMI, and immunosuppressive. Therefore, when
11 we analyzed the *TGFBI* -509 C>T variant, we found that patients carrying the TT genotype (in
12 the recessive genetic model) showed lower levels of C4 than those with CC+CT genotypes
13 (p=0.032) after adjusted by age, sex, ethnicity, BMI, and immunosuppressive drugs. There was
14 no association between haplotypes and laboratory parameters of disease activity, SLEDAI
15 score, and autoantibodies in SLE patients (data not shown).

16 Concerning the association between TGF- β 1 plasma levels and genotypes, we
17 demonstrated that *TGFBI* +869 CC genotype was inversely and independently associated with
18 TGF- β 1 plasma levels (p=0.044) (**Figure 1A**). However, no association was found between
19 *TGFBI* -509 C>T and TGF- β 1 plasma levels (**Figure 1B**). There was also no association
20 between haplotypes and TGF- β 1 plasma levels in SLE patients (data not shown). Finally, we
21 evaluated whether the *TGFBI* +869 T>C variant could have a differential effect on patients
22 with positive anti-dsDNA. Patients with positive anti-dsDNA and *TGFBI* +869 TC+CC
23 genotype had lower TGF- β 1 plasma levels than those with TT (p=0.004) (**Figure 1D**). On the
24 other hand, the TC+CC genotypes were directly associated with elevated TGF- β 1 plasma levels

1 in the absence of anti-dsDNA ($p=0.044$) (**Figure 1C**). All the results showed in Figure 1 were
2 adjusted by age, sex, ethnicity, BMI, and immunosuppressive drugs.

3

4 **Discussion**

5 The main finding of our study was that the *TGFBI* +869 CC genotype (recessive genetic
6 model) was associated with a 1.7-fold chance to have SLE diagnosis and with a reduction of
7 C4 and TGF- β 1 levels. Therefore, SLE patients with C allele of *TGFBI* +869 (homozygosity
8 or heterozygosity) and the presence of anti-dsDNA had reduced TGF- β 1 plasma levels.
9 Corroborating this finding, we observed the opposite result in patients without anti-dsDNA. In
10 addition, *TGFBI* -509 C>T was not associated with SLE susceptibility but the TT genotype
11 (recessive genetic model) demonstrated diminished levels of C4.

12 TGF- β 1 is an immunoregulatory cytokine responsible to maintain the immune tolerance
13 (Blobe; Schiemann; Lodish, 2000) and SLE patients had lower TGF- β 1 levels than healthy
14 controls (Ohtsuka et al., 1998; Lu et al. 2004; Sayed et al. 2004; Becker-Merok et al., 2010).
15 Thus, considering the important role of this cytokine in SLE pathophysiology, we investigated
16 the *TGFBI*+869 T>C (rs1800470) and *TGFBI*-509 C>T (rs1800469) variants in Brazilian SLE
17 patients. In the present study, we demonstrated that the *TGFBI* +869 CC genotype was
18 associated with a 1.7-fold chance to have SLE. Previous studies evaluated *TGFBI* +869 T>C
19 variant with SLE diagnosis but did not find any association (Wang et al., 2007; Sayed et al.,
20 2014). To date, this is the first study to demonstrated that *TGFBI* +869 CC genotype is
21 associated with SLE susceptibility.

22 In addition, our data demonstrated that *TGFBI* +869 CC genotype was independently
23 associated with reduced TGF- β 1 plasma levels. Our data are in disagreement with a previous

1 study that demonstrated reduced TGF- β 1 levels in the TT genotype (Sayed et al., 2014). The
2 *TGFBI* gene is located in the 19q13.2 chromosomal region and comprises 7 exons (Fujii et al.,
3 1986) in the signal peptide sequence, which functions to translocate newly synthesized proteins
4 across the membrane of the endoplasmic reticulum (Verner, Schatz, 1988). The +869 T>C
5 substitution may affect the function of the signal peptide, influencing intracellular traffic, or the
6 export efficiency of the TGF- β pre-protein (Yamada et al., 200). Our data suggested that the
7 increased chance to have SLE diagnosis in the CC genotype maybe due to the reduction of the
8 immunomodulatory role of TGF- β 1.

9 Regarding *TGFBI* +869 C>T, autoantibodies and, disease activity, the data are
10 controversial. In the present study, *TGFBI* +869 C>T was not associated with the presence of
11 autoantibodies and SLEDAI score, but patients carrying the CC genotype showed lower C4
12 levels than those with other genotypes. Wang et al. (2007) found that *TGFBI* +869 TT genotype
13 was associated with anti-SSA/Ro antibodies production and higher incidence of aseptic
14 necrosis, and the *TGFBI* +869 CC genotype had a higher frequency of anti-U1RNP antibodies
15 production than other genotypes. However, other authors found no correlation between *TGFBI*
16 variants and clinical and laboratory parameters of SLE (Schotte et al., 2003; Caserta et al., 2004;
17 Lu et al., 2004; Sayed et al., 2014). About C4 levels, the complement system plays an essential
18 role in the pathogenesis of SLE through the elimination of apoptotic debris, opsonization, and
19 clearance of immune complexes (Ghodke-puranik; Niewold, 2015). Failure in complement
20 activation leads to the deposition of cell debris that functions as immunogens for the production
21 of autoantibodies (Ahmadpoor; Dalili; Rostami, 2014). Its presence in tissues serves as a
22 diagnostic tool, and the decrease in serum complement components C4 and C3 as markers for
23 disease activity (Atkinson, 1986). In addition, diminished levels of C3 and C4 constitute the
24 criteria for determining the SLEDAI score (Bombardier et al., 1992).

1 In addition, we also evaluated whether the *TGFBI* +869 T>C variant could have a
2 differential effect on patients with positive anti-dsDNA. We found that patients with positive
3 anti-dsDNA and *TGFBI* +869 TC+CC genotype had lower TGF- β 1 plasma levels than TT.
4 While patients without anti-dsDNA and *TGFBI* +869 TC+CC genotypes had higher TGF- β 1
5 plasma levels than those with the TT genotype. The combined presence of the *TGFBI* +896
6 T>C and positive anti-dsDNA may result in a decrease in TGF- β 1 plasma levels in SLE
7 patients. TGF- β is responsible for regulating B cell activation and although mice with specific
8 B cell deficiency in TGF- β signaling do not show signs of autoimmunity, these cells have a
9 more activated phenotype, are hyper-responsive to normally weak immunogens and produce
10 more anti-dsDNA antibodies (Cazac; Roes, 2000).

11 Regarding *TGFBI* -509 C>T variant, there was not any association between the variant
12 and susceptibility, TGF- β 1 plasma levels, autoantibodies, and SLEDAI. However, *TGFBI* -509
13 TT genotype demonstrated lower C4 levels. Data about that variant and SLE clinical and
14 laboratory parameters are controversial. Previous studies also found no association with disease
15 susceptibility (Caserta et al., 2004; Lu et al., 2004). However, a study showed that *TGFBI* -509
16 T allele was associated with susceptibility and activity disease in the Polish population
17 (Paradowska-Gorycka et al., 2019). The *TGFBI* -509 C>T variant is located in the first negative
18 regulatory region and the T allele was associated with elevated TGF- β 1 levels due to loss of
19 negative regulation (Shah et al., 2006). In other diseases, the TT genotype was associated with
20 higher gene expression of TGF- β than the CC genotype (Cao et al., 2014; Guo et al., 2001).

21 In the present study, we also evaluated haplotypes structures of *TGFBI* +869 T>C and
22 *TGFBI* -509 C>T variants. Genetic variants do not exert great influence by itself (Terry;
23 Loukaci; Green, 2000) and haplotype analysis could be better to understand the association
24 between genetic variants and disease susceptibility. However, our results demonstrated no
25 association between the *TGFBI* haplotype structures and disease susceptibility. In agreement,

1 Rezaei et al. (2015) also found no significant association between *TGFBI* (codon 10/ codon
2 25) haplotype structures and juvenile-onset SLE susceptibility, after adjusted by Bonferroni
3 correction.

4 Previous results of the association between *TGFBI* +869 T>C and *TGFBI* -509 C>T
5 variants with SLE susceptibility, disease activity, and TGF- β 1 plasma levels, are still
6 controversial and inconsistent. Discrepancies between studies could probably be due to small
7 sample size, design study, genotyping methods, possible effects of disease activity, and SLE
8 therapies. Thus, additional studies with a larger number of SLE patients and the control of
9 extraneous variables are necessary to confirm the relationship between *TGFBI* genetic variants
10 and SLE parameters.

11 The limitations of this study must be considered. This is a case-control design, which does
12 not allow inferences on a causal relationship. Second, the small number of SLE patients reduces
13 the statistical power, being necessary additional case-control studies and future recruitment of
14 larger sample sizes. Thirdly, our study sample shows a relatively low disease activity as
15 indicated by a SLEDAI <6, and therefore, our findings may not be applicable to patients with
16 active disease. However, this study has some strengths such as adjusting for many confounding
17 variables including age, ethnicity, BMI, and SLE therapies. In addition, to our knowledge, this
18 is the first study to investigate the relationship between *TGFB* +869 T>C and *TGFB* -509 C>T
19 variant with susceptibility and disease activity in Brazilian SLE patients.

20 In conclusion, *TGFBI* +869 T>C can be used as a genetic marker for SLE susceptibility,
21 and both variants are predictors of disease activity. In addition, this is the first study to
22 demonstrate that TGF- β 1 plasma levels can be modulated by the interaction between *TGFBI*
23 +869 C allele, in homozygosity or heterozygosity, and the presence of anti-dsDNA.

24

1 **Declarations**

2 **Funding**

3 The study was supported by grants from Coordination for the Improvement of Higher
4 Level of Education Personnel (CAPES) and Institutional Program for Scientific Initiation
5 Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development
6 (CNPq).

7 **Conflict of interest**

8 The authors declare that they have no conflict of interest.

9 **Ethical approval**

10 This study was conducted after approval by the Institutional Research Ethics
11 Committees of University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 01865212.0.0000.5231). All
12 procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the
13 ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964
14 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1 Reference

- 2 Ahmadpoor, P.; Dalili, N.; Rostami, M. An update on pathogenesis of systemic lupus
3 erythematosus. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 2014; 8(3):171–184.
- 4 Atkinson, J.P. Complement activation and complement receptors in systemic lupus
5 erythematosus. *Springer Semin Immunopathol*. 1986; 9(2-3): 179-94.
- 6 Baltus, T. H. L. CCR5 Δ 32 (rs333) polymorphism is associated with the susceptibility to
7 systemic lupus erythematosus in female Brazilian patients. *Rheumatol Int*. 2016 Jan; 36(1):7-
8 15.
- 9 Becker-Merok, A., Eilertsen, G.O., Nossent, J.C. Levels of transforming growth factor-beta
10 are low in systemic lupus erythematosus patients with active disease. *Journal of*
11 *Rheumatology*. 2010; 37: 2039–2045.
- 12 Blobel, G.C., Schieman, W.P., Lodish, H.F. Role of transforming growth factor beta in
13 human disease. *New England Journal of Medicine*. 2000; 342: 1350-8.
- 14 Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Caron, D., Chang, C. H., Austin, Schur, P.
15 H. (1992). Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis &*
16 *Rheumatism*. 1992; 35(6): 630–640.
- 17 Cao H, Zhou Q, Lan R, et al (2014) A Functional Polymorphism C-509T in TGF β -1 Promoter
18 Contributes to Susceptibility and Prognosis of Lone Atrial Fibrillation in Chinese Population.
19 *PLoS One*. 2014; 9 (11):e112912.
- 20 Caserta, T. M., Knisley, A. A., Tan, F. K., Arnett, F. C., Brown, T. L. Genotypic analysis of
21 the TGF beta-509 allele in patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's
22 syndrome. *Annales de Génétique*. 2004; 47: 359–363.
- 23 Costenbader, K. H., Feskanich, D., Stampfer, M.J., Karlson, E.W. Reproductive and
24 menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis &*
25 *Rheumatism*. 2007; 56(4): 1251–1262.
- 26 Dang, H., Geiser, A. G., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Kong, L., Fernandes, G., and Talal,

- 1 N. SLE-like autoantibodies and Sjogren's syndrome-like lymphoproliferation in TGF-beta
2 knockout mice. *J Immunol.* 1995; 155: 3205-3212.
- 3 Delongui, F. et al. C-reactive protein +1444CT (rs1130864) genetic polymorphism is
4 associated with the susceptibility to systemic lupus erythematosus and C-reactive protein
5 levels. *Clinical Rheumatology.* 2017; 36(8).
- 6 Fujii, D., Brissenden, J. E., Derynck, R., Francke, U. Transforming Growth Factor β Gene
7 Maps to Human Chromosome19 Long Arm and to Mouse Chromosome 7. *Somatic Cell and*
8 *Molecular Genetics.* 1986; 12 (3): 281-288.
- 9 Ghodke-Puranik, Y., Niewold, T. B. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A
10 comprehensive review. *Journal of Autoimmunity.* 2015; 64: 125-136.
- 11 Grainger, D. J., Mosedale, D. E., Metcalfe, J. C. TGF-b in blood: a complex problem.
12 *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2000; 11:133-145.
- 13 Guimarães, P. M. et al. Cytokines in systemic lupus erythematosus: far beyond Th1/Th2
14 dualism lupus: cytokine profiles. *Immunology and Cell Biology.* 2017; 00: 1–8.
- 15 Guo, Q. et al. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic
16 therapies. *Bone Research.* 2018; 6:15.
- 17 Kuhn, A., Wenzel, J., Bijl, M. Lupus erythematosus revisited. *Seminars in Immunopathology.*
18 2015; 38(1): 97–112.
- 19 Lu, L.Y., Cheng, H. H., Sung, P. K., Yeh, J. J., Shiue, L. Y., Chen, A. Single-nucleotide
20 polymorphisms of transforming growth factor-beta 1 gene in Taiwanese patients with
21 systemic lupus erythematosus. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2004; 37
22 (3): 145-152.
- 23 Mok, C. C. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Pathology.*
24 2003; 56(7): 481–490.
- 25 Ohtsuka, K., Gray, J.D., Stimmler, M.M., Toro, B., Horwitz, D.A. Decreased production of
26 TGF-beta by lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of*

- 1 Immunology. 1998; 160: 2539–2545.
- 2 Paradowska-Gorycka, A. et al. IL-6 and TGF- β polymorphisms, their serum levels, as well as
3 HLA profile, in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental*
4 *Rheumatology*. 2019; 37: 1-13.
- 5 Parks, C. G., Santos, A. S. E., Barbhaiya, M., Costenbader, K. H. Understanding the role of
6 environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus. *Best Practice &*
7 *Research Clinical Rheumatology*. 2017; XXX: 1-15.
- 8 Pedro, E. M. Trace Elements Associated with Systemic Lupus Erythematosus and Insulin
9 Resistance. *Biol Trace Elem Res*. 2019 Sep; 191(1):34-44.
- 10 Petri, M., Genovese, M., Engle, E., Hochberg, M. Definition, incidence, and clinical
11 description of flare in systemic lupus erythematosus: a prospective cohort study. *Arthritis*
12 *Rheumatism* 34:937–944 (1991).
- 13 Petri, M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating
14 Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism*. 2012;
15 62: 2677-2686.
- 16 Rezaei, A. et al. Lack of association between interleukin-10, transforming growth factor-beta
17 gene polymorphisms and juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Clinical*
18 *Rheumatology*. 2015; 34 (6): 1059–1064.
- 19 Sayed, S. K. et al. Single nucleotide polymorphism T869C of transforming growth factor-beta
20 1 gene and systemic lupus erythematosus: association with disease susceptibility and lupus
21 nephritis. *Egyptian Journal Immunology*. 2014; 1(2): 9-21.
- 22 Schotte, H. et al. The transforming growth factor-b1 gene polymorphism (G915C) is not
23 associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2003;12: 86-92.
- 24 Shah, R., Rahaman, B., Hurley, C. K., Posh, P. E. Allelic diversity in the *TGFBI* regulatory
25 region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. *Hum Genet*.
26 2006; 119: 61–74.

- 1 Solé, X. et al. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*.
2 2006; 22:1928–1929.
- 3 Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction
4 from population data. *American Journal of Human Genetics*. 2001; 68:978–989.
- 5 Stephens, M., Scheet, P. (2005). Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype
6 inference and missing-data imputation. *American Journal of Human Genetics*. 2005; 76:449–
7 462.
- 8 Terry, C.F., Loukaci, V., Green, F.R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on
9 interleukin 6 transcriptional regulation. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 18138–44.
- 10 Tsao, B. P. Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr. Opin. Rheumatol*.
11 2004; 16: 513-521.
- 12 Tsokos, G. C., Lo, M. S., Reis, P. C., & Sullivan, K. E. New insights into the
13 immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;
14 2(12):716–730.
- 15 Verner, K., Schatz, G. Protein translocation across membranes. *Science*. 1988;
16 241(4871):1307-1313.
- 17 Wang, B. et al. Transforming growth factor beta 1 gene polymorphism in japanese patients
18 with systemic lupus erythematosus. *Kobe J. Med. Sci*. 2007; 53 (1): 15-23.
- 19 Yamada, Y., Okuizumi, H., Miyauchi, A., Takagi, Y., Ikeda, K., Harada, A. Association of
20 transforming growth factor beta1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women.
21 *Arthritis Rheum*. 2000; 43(2): 452-460
- 22 Yap, D. Y. H., Lai, K. N. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus
23 erythematosus - from bench to bedside. *Nephrology*. 2013; 18(4): 243–255.
- 24
- 25

Table 1 Socio-demographic, clinical and laboratory data in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls.

| | Controls (n=165) | SLE (n=203) | p- value* |
|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Sex (Female/Male) | 152 (92.1)/13 (7.9) | 191 (94.1)/12 (5.9) | 0.456 |
| Ethnicity (Caucasian/Not-Caucasian) | 120(72.7)/45(27.3) | 129(63.5)/74(36.5) | 0.061 |
| Age (years) | 35 (28–44) | 39 (30–50) | 0.008 |
| Body mass index (kg/cm ²) | 23.9 (21.7–27.7) | 26.6 (23.6–31.1) | <0.001 |
| Disease duration (years) | - | 10 (4–15) | |
| SLEDAI | - | 2 (1–6) | |
| SLEDAI \geq 6 | - | 54 (27.0) | |
| Anti-dsDNA (IU/mL) | - | 28.4 (8.3–77.0) | |
| Anti-dsDNA Positive | - | 119 (58.9) | |
| Anti-nucleosome Positive | - | 140 (24.7) | |
| Anti-SM Positive | - | 32 (24.1) | |
| Anti-U1RNP Positive | - | 55 (43.3) | |
| Prednisone | - | 176 (88.0) | |
| Antimalarials | - | 146 (74.5) | |
| Mycophenolate | - | 44 (22.4) | |
| Other immunosuppressive | - | 87 (44.4) | |

Mann Whitney test. Data were expressed by median and percentile (25%–75%). χ^2 : results of analyses of contingency tables. Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%). SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; Anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA; Anti-SM: anti-Smith; Anti-U1RNP: anti-U1 ribonucleoprotein.

Table 2 Distribution of genotypes and allele frequencies of *TGFBI* variants between patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls.

| Genetic model | | Controls ^a | SLE ^b | OR (95% CI) | p-value* |
|---|-------|-----------------------|------------------|---------------------|--------------|
| <i>TGFBI</i> +869 T>C (rs1800470)¹ | | | | | |
| Allelic | T | 176 (54.3) | 199 (49.0) | Reference | |
| | C | 148 (45.7) | 207 (51.0) | 1.228 (0.911–1.657) | 0.178 |
| Codominant | TT | 43 (26.5) | 52 (25.6) | Reference | |
| | TC | 90 (55.6) | 95 (46 q.8) | 0.884 (0.531–1.474) | 0.638 |
| | CC | 29 (17.9) | 56 (27.6) | 1.575 (0.847–2.927) | 0.151 |
| Dominant | TT | 43 (26.5) | 52 (25.6) | Reference | |
| | TC+CC | 119 (73.5) | 151 (74.4) | 1.052 (0.648–1.709) | 0.836 |
| Recessive | TT+TC | 133 (82.1) | 147 (72.4) | Reference | |
| | CC | 29 (17.9) | 56 (27.6) | 1.710 (1.020–2.866) | 0.042 |
| Overdominant | TT+CC | 72 (44.4) | 108 (53.2) | Reference | |
| | TC | 90 (55.6) | 95 (46.8) | 0.716 (0.468–1.094) | 0.122 |
| <i>TGFBI</i> -509 C>T (rs1800469)² | | | | | |
| Allelic | C | 204 (61.8) | 245 (60.9) | Reference | |
| | T | 126 (38.2) | 157 (39.1) | 1.030 (0.758–1.398) | 0.851 |
| Codominant | CC | 58 (35.1) | 79 (39.3) | Reference | |
| | CT | 88 (53.3) | 87 (43.3) | 0.728 (0.458–1.157) | 0.179 |
| | TT | 19 (11.5) | 35 (17.4) | 1.319 (0.676–2.573) | 0.417 |
| Dominant | CC | 58 (35.1) | 79 (39.3) | Reference | |
| | CT+TT | 107 (64.8) | 122 (60.7) | 0.834 (0.538–1.295) | 0.419 |
| Recessive | CC+CT | 146 (88.5) | 166 (82.6) | Reference | |
| | TT | 19 (11.5) | 35 (17.4) | 1.579 (0.854–2.918) | 0.145 |
| Overdominant | CC+TT | 77 (46.7) | 114 (56.7) | Reference | |
| | CT | 88 (53.3) | 87 (43.3) | 0.674 (0.440–1.031) | 0.069 |

¹The genotyping was successful in 203 cases and 162 controls for rs1800470;

²The genotyping was successful in 201 cases and 165 controls for rs1800469.

^aHardy-Weinberg equilibrium χ^2 : rs1800470=1.51, p>0.05; rs1800469=2.77, p>0.05;

^bHardy-Weinberg equilibrium χ^2 : rs1800470=0.82, p>0.05; rs1800469=1.65, p>0.05;

χ^2 : results of analyses of contingency tables. Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%).

Bold values represent statistically significant values.* Adjusted by age, sex, and ethnicity. SLE: systemic lupus erythematosus; *TGFBI*: transforming growing factor-beta 1 gene; OR: odds ratio; CI: confidence interval

Table 3 Haplotype frequencies of *TGFBI* genetic variants in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and controls.

| <i>TGFBI</i> +869 (rs1800470) | <i>TGFBI</i> -509 (rs1800469) | Controls frequency | SLE frequency | OR (95% CI) | p-value* |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|---------------|-------------------|----------|
| T | C | 0.535 | 0.487 | Reference | 1 |
| C | T | 0.378 | 0.391 | 1.12 (0.81–1.54) | 0.49 |
| C | C | 0.083 | 0.118 | 1.45 (0.86–2.45) | 0.11 |
| T | T | 0.003 | 0.002 | 1.16 (0.07–19.09) | 0.92 |

Bold values represent statistically significant values: OR (odds ratio) and CI (confidence interval) 95%. $D^2=0.985$ and $r^2=0.642$ * Adjusted by age, sex, and ethnicity. SLE: systemic lupus erythematosus; *TGFBI*: transforming growing factor-beta 1 gene; T: thymine; C: cytosine.

Table 4 Disease activity parameters and autoantibodies according to *TGFB1* genetic variants in systemic lupus erythematosus (SLE) patients.

| <i>TGFB1</i> +869 T>C | TT+TC (n=147) | CC (n=56) | OR (95% CI) | p-value |
|--------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------|
| C3 (mg/dL) | 109.5 (90.2–128.0) | 113.0 (99.2–137.0) | – | 0.273 |
| C4 (mg/dL) | 20.8 (14.5–26.6) | 17.7 (12.5–24.4) | – | 0.040 |
| SLEDAI \geq 6 | 39 (27.1) | 15 (26.8) | 0.879 (0.410–1.882) | 0.740 |
| Anti-dsDNA Positive | 87 (59.6) | 32 (57.1) | 1.044 (0.533–2.046) | 0.901 |
| Anti-nucleosome Positive | 98 (74.2) | 42 (77.8) | 1.067 (0.474–2.398) | 0.876 |
| Anti-SM Positive | 23 (25.0) | 9 (22.0) | 0.769 (0.293–2.023) | 0.595 |
| Anti-U1RNP Positive | 36 (39.6) | 19 (51.4) | 1.455 (0.627–3.380) | 0.383 |
| <i>TGFB1</i> -509 C>T | CC+CT (n=166) | TT (n=35) | OR (95% CI) | p-value |
| C3 (mg/dL) | 113.0 (91.3–131.0) | 109.0 (98.0–133.0) | – | 0.764 |
| C4 (mg/dL) | 20.8 (14.6–26.5) | 15.6 (11.5–24.4) | – | 0.032 |
| SLEDAI \geq 6 | 42 (25.8) | 12 (34.3) | 1.457 (0.618–3.435) | 0.390 |
| Anti-dsDNA Positive | 98 (59.4) | 21 (60.0) | 1.337 (0.595–3.004) | 0.483 |
| Anti-nucleosome Positive | 112 (74.7) | 27 (77.1) | 1.116 (0.426–2.923) | 0.824 |
| Anti-SM Positive | 26 (25.0) | 6 (21.4) | 0.858 (0.291–2.529) | 0.781 |
| Anti-U1RNP Positive | 42 (42.0) | 13 (48.1) | 1.116 (0.426–2.923) | 0.824 |

Results of logistic regression analysis adjusted by age, sex, ethnicity, body mass index, and immunosuppressive. Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) or median and percentile (25%–75%). SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; Anti-dsDNA: anti-double stranded DNA; anti-SM: anti-Smith; anti-U1RNP: anti-U1 ribonucleoprotein; OR: odds ratio; CI: confidence interval; C3: complement 3; C4: complement 4.

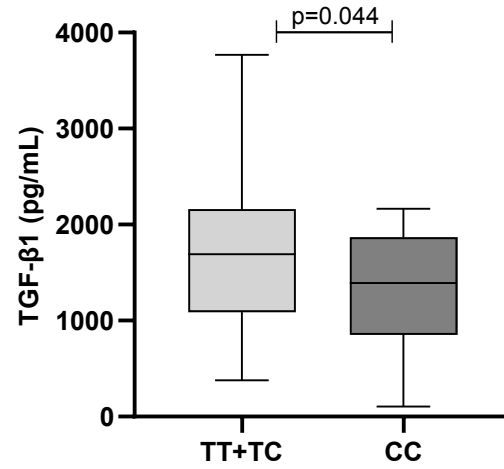
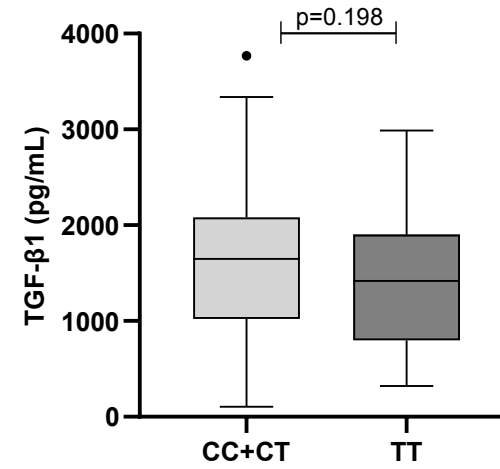
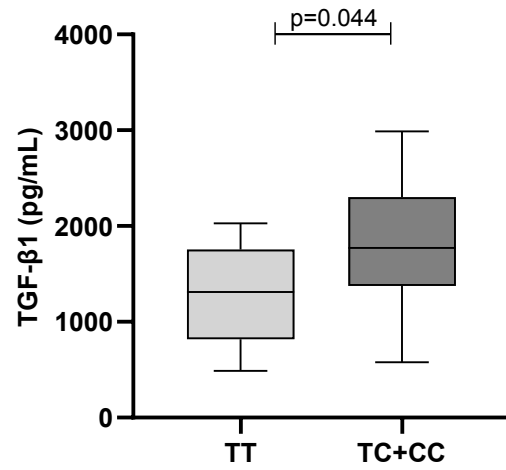
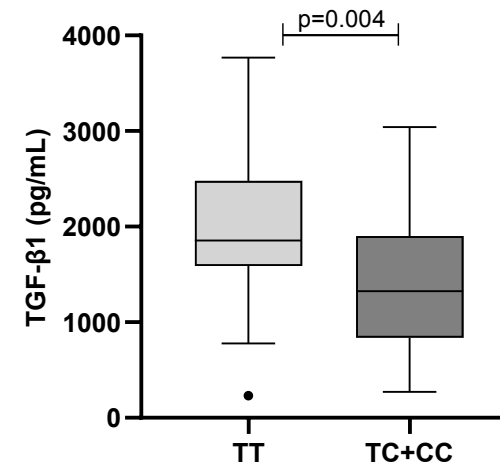
A) SLE patients: *TGFB1* +869 T>CB) SLE patients: *TGFB1* -509 C>TC) Anti-dsDNA negative: *TGFB1* +869 T>CD) Anti-dsDNA positive: *TGFB1* +869 T>C

Figure 1. A) Transforming growth factor (TGF)- β 1 plasma levels in patients systemic lupus erythematosus (SLE) to *TGFB1* +869 T>C variants (recessive genetic model); B) TGF- β 1 plasma levels plasma levels in SLE patients according to *TGFB1* -509 C>T variants (recessive genetic model); C) TGF- β 1 plasma levels in patients with anti-dsDNA negative according to *TGFB1* +869 T>C variants (dominant genetic model); D) TGF- β 1 plasma levels plasma levels in patients with anti-dsDNA positive according to *TGFB1* +869 T>C variants (dominant genetic model). Results expressed as median and percentile (25–75). p-value adjusted by age, sex, ethnicity, body mass index, and immunosuppressive.

1 6 CONCLUSÃO

2

3 Artigo 1:

- 4 – O genótipo AA e o alelo A da variante rs3761548 do *FOXP3* estão associados
5 com o diagnóstico de LES.
6
- 7 – O haplótipo A/A do modelo dominante das variantes do *FOXP3*, demonstrou
8 cerca de 3,7 vezes mais chance de desenvolver o LES.
9
- 10 – O haplótipo G/C do modelo dominante das variantes do *FOXP3* apresentou
11 efeito protetor de 40% na suscetibilidade ao LES.
12
- 13 – Pacientes com genótipo AA da variante rs2232365 do *FOXP3* apresentaram
14 maior frequência de anticorpos anti-dsDNA e anti-U1RNP.
15
- 16 – O haplótipo A/C do modelo dominante das variantes do *FOXP3*, apresentou
17 maiores níveis de SLEDAI e o haplótipo A/C do modelo recessivo apresentou
18 maior frequência de anti-dsDNA e anti-U1RNP e cerca de 2,5 vezes mais
19 chance de desenvolver NL.
20
- 21 – Pacientes com o haplótipo GCGC das variantes do *FOXP3* exibiram níveis
22 plasmáticos mais elevados de TGF- β 1.

1

2 **Artigo 2:**

3 – O genótipo CC da variante rs1800470 do *TGFB1* está associado com o
4 diagnóstico de LES.

5

6 – Pacientes com o genótipo CC da variante rs1800470 do *TGFB1* apresentaram
7 menores níveis plasmáticos de C4 e TGF- β 1.

8

9 – Pacientes com o genótipo TT da variante rs1800469 do *TGFB1* exibiram
10 menores níveis plasmáticos de C4.

11

12 – Pacientes com anti-dsDNA positivo e genótipo TC+CC da variante rs1800470
13 do *TGFB1*, apresentaram menores níveis de TGF- β 1.

14

15 – Pacientes com anti-dsDNA negativo e genótipo TC+CC da variante rs1800470
16 do *TGFB1*, apresentaram maiores níveis de TGF- β 1.

17

18

19

20

21

22

23

24

1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 O presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas.
3 A principal limitação é que se trata de um estudo de caso-controle, o que não permite
4 inferências sobre relações causais. Além disso, o número de pacientes com LES é
5 relativamente pequeno, assim como, pacientes com doença ativa (SLEDAI \geq 6). No
6 entanto, nosso estudo apresenta alguns pontos fortes, como o ineditismo de algumas
7 avaliações e variantes genéticas escolhidas, assim como também a avaliação em
8 haplótipos destas variantes genéticas e o controle de fatores confundidores nos dados
9 analisados, o que que poderia prejudicar a interpretação dos resultados obtidos.

10 Este é o primeiro estudo a avaliar a associação das variante -924 G>A
11 (rs2232365) e -3279 C>A (rs3761548) do *FOXP3* na população brasileira com LES.
12 Até o presente momento, nenhum estudo foi realizado para avaliar o papel da variante
13 -924 G>A do *FOXP3* em qualquer população com LES. Além disso, esse é o primeiro
14 estudo a avaliar a associação das variantes, isoladamente ou em haplótipos, com a
15 suscetibilidade, presença de nefrite e atividade da doença.

16 Além disso, as variantes do *TGFB1* também demonstraram resultados
17 promissores com a suscetibilidade e atividade da doença. Assim como o *FOXP3*, este
18 é o primeiro estudo a avaliar as variantes do *TGFB1* na população brasileira, e o
19 primeiro estudo a demonstrar que os níveis plasmáticos de TGF- β 1 podem ser
20 modulados pela interação entre o alelo *TGFB1* +869 C, em homozigose ou
21 heterozigose, e a presença de anticorpos anti-dsDNA.

22 Nosso estudo demonstra a importância de se avaliar o envolvimento das Tregs
23 e das variantes genéticas do *FOXP3* e do *TGFB1* na fisiopatologia e suscetibilidade
24 do LES. Uma melhor compreensão das bases genéticas nos distúrbios autoimunes
25 pode constituir um passo em direção ao entendimento da imunologia no processo
26 fisiopatológico, e sugerir novos rumos na pesquisa terapêutica.

27

28

29

1 REFERÊNCIAS

- 2 AHMADPOOR, Pedram; DALILI, Nooshin; ROSTAMI, Mehrdad. An update on
3 pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Iranian Journal of Kidney**
4 **Diseases** v. 8, n. 3, p. 171–184, 2014.
- 5 AHMED, H. H. et al. Association between TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G
6 polymorphisms and systemic lupus erythematosus. **Molecular Biology Reports**, v.
7 41, n. 4, p. 2029–2036, 2014.
- 8 ALEXANDER Y. RUDENSKY. Regulatory T Cells and Foxp3. **Immunological**
9 **Reviews**, v. 241, n. 1, p. 260–268, 2011.
- 10 ARINGER, M. et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College
11 of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Annals of**
12 **the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. 9, p. 1151–1159, 2019.
- 13 BANIN HIRATA, B. K. et al. FOXP3 Allelic Variants and Haplotype Structures Are
14 Associated with Aggressive Breast Cancer Subtypes. **Disease Markers**, v. 2017,
15 2017.
- 16 BARBHAIYA, M.; COSTENBADER, K. H. Ultraviolet radiation and systemic lupus
17 erythematosus. **Lupus**, v. 23, n. 6, p. 588–595, 2014.
- 18 BARSOVA R. M. et al. Contribution of the TGF- β 1 gene to myocardial infarction
19 susceptibility. **Acta Naturae**, 2012; v. 4, p. 74-9, 2012.
- 20 BATU, E. D. Monogenic systemic lupus erythematosus: insights in pathophysiology.
21 **Rheumatology International**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2018.
- 22 BENGTTSSON, A.A., RONNBLOM, L. Role of interferons in SLE. **Best Pract Res Clin**
23 **Rheumatol**, v. 31, p. 415–428, 2017.
- 24 BLUESTONE, J.A.; ABBAS, A.K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nature**
25 **Reviews Immunology**, v. 3, p. 253–257, 2003.
- 26 BONELLI, M. et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in
27 patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **International Immunology**, v.
28 20, n. 7, p. 861–868, 2008.
- 29 BORCHERS, A. T. et al. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus.
30 **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. A277–A287, 2010.
- 31 BOUTS, Y. M. et al. Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE.
32 **Autoimmunity**, v. 45, p. 597–601, 2012.
- 33 BRUCE, I. N. et al. Factors associated with damage accrual in patients with systemic

- 1 lupus erythematosus: Results from the Systemic Lupus International Collaborating
2 Clinics (SLICC) Inception Cohort. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 9, p.
3 1706–1713, 2015.
- 4 CAMPBELL, D. J.; KOCH, M. A. Phenotypical and functional specialization of
5 FOXP3+ regulatory T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 119–130,
6 2011.
- 7 CAO, D. et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺
8 T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. **European Journal**
9 **of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 215–223, 2003.
- 10 CAO, X. et al. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-
11 Mediated Suppression of Tumor Clearance. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 635–646, 2007.
- 12 CARTER, E. E.; BARR, S. G.; CLARKE, A. E. The global burden of SLE: Prevalence,
13 health disparities and socioeconomic impact. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12,
14 n. 10, p. 605–620, 2016.
- 15 CASERTA, T. M. et al. Genotypic analysis of the TGF beta-509 allele in patients with
16 systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Annales de Génétique*, v.
17 47, p. 359-363, 2004.
- 18 CECCARELLI, F. et al. Joint involvement in systemic lupus erythematosus: From
19 pathogenesis to clinical assessment. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 47,
20 n. 1, p. 53–64, 2017.
- 21 CELEDÓN, J.C. et al. The transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) gene is
22 associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Humam Molecular*
23 *Genetics*, v. 13, p. 1649-56, 2004.
- 24 CHENG, Z. Y.; GUO, Y.; MING, L. Functional Foxp3 polymorphisms and the
25 susceptibility to cancer: An update meta-analysis. **Medicine (United States)**, v. 97,
26 n. 34, p. 1–8, 2018.
- 27 CHIN, D. et al. What is transforming growth factor-beta (TGF-β)? **The British**
28 **Association of Plastic Surgeons**, v. 57, p. 215–221, 2004.
- 29 COFFER, P. J.; BURGERING, B. M. T. Forkhead-box transcription factors and their
30 role in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 11, p. 889–899,
31 2004.
- 32 COLONNA, L.; LOOD, C.; ELKON, K. B. Beyond apoptosis in lupus. **Current**
33 **Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 5, p. 459–466, 2014.
- 34 COMTE, D.; KARAMPETSOU, M.P.; TSOKOS, G.C. T cells as a therapeutic target in
35 SLE. *Lupus*, v. 24, n. 4-5, p. 351-363, 2015.

- 1 CRETNEY, E.; KALLIES, A.; NUTT, S. L. Differentiation and function of Foxp3+
2 effector regulatory T cells. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 74–80, 2013.
- 3 CRUVINEL, W. DE M. et al. Células T regulatórias naturais (TREGS) em doenças
4 reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 6, p. 342–355, 2008.
- 5 D'AMICO, F. et al. Association between rs2294020 in X-linked CCDC22 and
6 susceptibility to autoimmune diseases with focus on systemic lupus erythematosus.
7 **Immunology Letters**, v. 181, p. 58–62, 2017.
- 8 DARIO A. A. VIGNALI, L. W. C. AND C. J. W. How regulatory K cells work. **Nat rev**
9 **immunol**, v. 8, n. 7, p. 523–532, 2008.
- 10 DEJACO, C. et al. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases.
11 **Immunology**, v. 117, n. 3, p. 289–300, 2006.
- 12 DEVAUD, C.; DARCY, P. K.; KERSHAW, M. H. Foxp3 expression in T regulatory
13 cells and other cell lineages. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 9, p.
14 869–876, 2014.
- 15 DING, Y.; XU, J.; BROMBERG, J. S. Regulatory T cell migration during an immune
16 response. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 4, p. 174–180, 2012.
- 17 DORIA, A. et al. The new targeted therapy in systemic lupus erythematosus: Is the
18 glass half-full or half-empty? **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 11, p. 1119–1124,
19 2017.
- 20 DUNNING, A.M. et al. A transforming growth factor beta1 signal peptide variant
21 increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive
22 breast cancer. **Cancer Research**, v. 63, p. 2610-5, 2003.
- 23 FALASINNU, T. et al. The Representation of Gender and Race/Ethnic Groups in
24 Randomized Clinical Trials of Individuals with Systemic Lupus Erythematosus.
25 **Current Rheumatology Reports**, v. 20, n. 4, 2018.
- 26 FANOURIKIS, A. et al. 2019 Update of the EULAR recommendations for the
27 management of systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**,
28 v. 78, n. 6, p. 736–745, 2019.
- 29 FELTEN, R. et al. The 2018 pipeline of targeted therapies under clinical development
30 for Systemic Lupus Erythematosus: a systematic review of trials. **Autoimmunity**
31 **Reviews**, v. 17, n. 8, p. 781–790, 2018.
- 32 FLAUZINO, T. et al. The rs3761548 FOXP3 variant is associated with multiple
33 sclerosis and transforming growth factor β 1 levels in female patients. **Inflammation**
34 **Research**, v. 68, n. 11, p. 933-943, 2019.

- 1 FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the
2 development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v.
3 4, n. 4, p. 330–336, 3 abr. 2003.
- 4 FU, S. M. et al. Anti-dsDNA Antibodies are one of the many autoantibodies in
5 systemic lupus erythematosus. **F1000Research**, v. 4, n. F1000 Faculty Rev, p. 939–
6 945, 2015.
- 7 FUJII, D. et al. Transforming growth factor/ gene maps to human chromosome 19
8 long arm and to mouse chromosome 7. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v.
9 12, n. 3, p. 281-288, 1986.
- 10 GAO, L. et al. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients.
11 **Journal of Dermatological Science**, v. 57, n. 1, p. 51–56, 2010.
- 12 GHEITA, T. A. et al. Anti-dsDNA titre in female systemic lupus erythematosus
13 patients: relation to disease manifestations, damage and antiphospholipid antibodies.
14 **Lupus**, v. 27, n. 7, p. 1081–1087, 2018.
- 15 GHODKE-PURANIK, Y.; NIEWOLD, T. B. Immunogenetics of systemic lupus
16 erythematosus: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 64, p. 125–
17 136, 2015.
- 18 GIANG, S.; LA CAVA, A. Regulatory T Cells in SLE: Biology and Use in Treatment.
19 **Current Rheumatology Reports**, v. 18, n. 11, 2016.
- 20 GIBSON, W. T.; HAYDEN, M. R. Mycophenolate mofetil and atherosclerosis: Results
21 of animal and human studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.
22 1110, p. 209–221, 2007.
- 23 GILES, B. M.; BOACKLE, S. A. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in
24 the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Immunologic Research**, v. 55,
25 n. 1–3, p. 10–21, 2013.
- 26 GLADMAN, D.D. et al. Cross-cultural validation of three disease activity indices in
27 systemic lupus erythematosus. **Journal Rheumatology**, v.19, p.608-11, 1992.
- 28 GLADMAN, D. D.; IBANEZ, D.;UROWITZ, M. B. Systemic lupus erythematosus
29 disease activity index 2000. **Journal Rheumatology**, v. 29, p. 288-291, 2002.
- 30 GORDON, C. et al. The British Society for Rheumatology guideline for the
31 management of systemic lupus erythematosus in adults. **Rheumatology (Oxford,**
32 **England)**, v. 57, n. 1, p. e1–e45, 2018.
- 33 GRIMALDI, C. M. et al. Hormonal modulation of B cell development and repertoire
34 selection. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 7, p. 811–820, 2005.

- 1 GRYGIEL-GÓRNIAK, B.; PUSZCZEWICZ, M. J. The influence of endogenous and
2 exogenous sex hormones on systemic lupus erythematosus in pre- and
3 postmenopausal women. **Menopausal Review**, v. 4, n. 135, p. 262–266, 2014.
- 4 GUIMARÃES, P. M. et al. Cytokines in systemic lupus erythematosus: Far beyond
5 Th1/Th2 dualism lupus: Cytokine profiles. **Immunology and Cell Biology**, v. 95, n.
6 9, p. 824–831, 2017.
- 7 HE, Y. et al. FoxP3 rs3761548 polymorphism predicts autoimmune disease
8 susceptibility: A meta-analysis. **Human Immunology**, v. 74, n. 12, p. 1665–1671,
9 2013.
- 10 HEJAZI, E. Z.; WERTH, V. P. Cutaneous Lupus Erythematosus: An Update on
11 Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. **American Journal of Clinical**
12 **Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 135–146, 2016.
- 13 HOOGENDOORN, B. et al. Functional analysis of human promoter polymorphisms.
14 **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 18, p. 2249–2254, 2003.
- 15 HORI S, NOMUTA T, S. S. **Control of Regulatory T Cell Development by the**
16 **Transcription Factor Foxp3** Author (s): Shohei Hori , Takashi Nomura and
17 **Shimon Sakaguchi** Published by : American Association for the Advancement
18 of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3833558>. [s.l: s.n.].
- 19 HUEHN, J.; BEYER, M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T
20 cells. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 1, p. 10–18, 2015.
- 21 HUEHN, J.; POLANSKY, J. K.; HAMANN, A. Epigenetic control of FOXP3
22 expression: The key to a stable regulatory T-cell lineage? **Nature Reviews**
23 **Immunology**, v. 9, n. 2, p. 83–89, 2009.
- 24 HUGHES, G. C.; CHOUBEY, D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by
25 oestrogen and progesterone. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 12, p. 740–
26 751, 2014.
- 27 ILLEI, G.G. et al. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety,
28 preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase
29 I dosage-escalation study. **Arthritis Rheumatology**, v. 62, p.542–552, 2010.
- 30 INFANTINO, M. et al. The impact of biological treatments on the anti-dsDNA and
31 anti-nucleosome tests. **Lupus**, v. 27, n. 1, p. 40–48, 2018.
- 32 INOUE, C. J. **Análise das variantes genéticas do FOXP3 (rs2232365 e**
33 **rs3761548) e dos níveis plasmáticos da interleucina 10 e do fator de**
34 **crescimento transformador beta 1 na suscetibilidade e na atividade das**
35 **doenças inflamatórias intestinais**. 2020. 109 f. Dissertação (Mestrado em
36 Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná,

- 1 2020.
- 2 ISENBERG, D. et al. Influence of race/ethnicity on response to lupus nephritis
3 treatment: the ALMS study. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 49, n. 1, p. 128–
4 140, 2010.
- 5 JANSSENS, W. et al. CD4 + CD25 + T Cells Lyse Antigen-Presenting B Cells by
6 Fas-Fas Ligand Interaction in an Epitope-Specific Manner . **The Journal of**
7 **Immunology**, v. 171, n. 9, p. 4604–4612, 2003.
- 8 JENSEN, M. A.; NIEWOLD, T. B. Interferon regulatory factors: Critical mediators of
9 human lupus. **Translational Research**, v. 165, n. 2, p. 283–295, 2015.
- 10 JEONG, D. Y. et al. Genetic variation and systemic lupus erythematosus: A field
11 synopsis and systematic meta-analysis. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 6, p. 553–
12 566, 2018.
- 13 KIM, J. W. et al. Risk of retinal toxicity in longterm users of hydroxychloroquine.
14 **Journal of Rheumatology**, v. 44, n. 11, p. 1674–1679, 2017.
- 15 KIPEN, Y.; LITTLEJOHN, G.O.; MORAND, E.F. Methotrexate use in systemic lupus
16 erythematosus. **Lupus**, v. 6, n. 4, p. 385-389, 1997.
- 17 KUHN, A.; WENZEL, J.; BIJL, M. Lupus erythematosus revisited. **Seminars in**
18 **Immunopathology**, v. 38, n. 1, p. 97–112, 2016.
- 19 LAHITA, R. G. The immunoendocrinology of systemic lupus erythematosus. **Clinical**
20 **Immunology**, v. 172, p. 98–100, 2016.
- 21 LAN, Y. et al. Association of transcription factor FOXP3 gene polymorphism with
22 genetic susceptibility to systematic lupus erythematosus in Guangxi Zhuang
23 population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, v. 27, p. 433–6, 2010.
- 24 LA PAGLIA, G. M. C. One year in review 2017: systemic lupus erythematosus.
25 **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 35, p. 551-561, 2017.
- 26 LI, Q. et al. A comprehensive review of immune-mediated dermatopathology in
27 systemic lupus erythematosus. **Journal of Autoimmunity**, v. 93, p. 1–15, 2018.
- 28 LIN, S. C. et al. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T
29 cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. **European**
30 **Journal of Clinical Investigation**, v. 37, n. 12, p. 987–996, 2007.
- 31 LIN, Y. C. et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in FOXP3 gene with
32 systemic lupus erythematosus susceptibility: A case-control study. **Lupus**, v. 20, n. 2,
33 p. 137–143, 2011.

- 1 LINDLEY, S. et al. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from
2 patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 92–99, 2005.
- 3 LISNEVSKAIA, L.; MURPHY, G.; ISENBERG, D. Systemic lupus erythematosus.
4 **The Lancet**, v. 384, n. 9957, p. 1878–1888, 2014.
- 5 LIU, M. F. et al. Decreased CD4+CD25+ T Cells in Peripheral Blood of Patients with
6 Systemic Lupus Erythematosus. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, n. 2,
7 p. 198–202, 2004.
- 8 LOPES, J. E. et al. Analysis of FOXP3 Reveals Multiple Domains Required for Its
9 Function as a Transcriptional Repressor. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5,
10 p. 3133–3142, 2006.
- 11 LU, L. et al. Single-nucleotide polymorphisms of transforming growth factor-beta1
12 gene in Taiwanese patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of**
13 **Microbiology Immunology and Infection**, v.37, n. 3, p.145-52, 2004.
- 14 MALKIEL, S. et al. Plasma cell differentiation pathways in systemic lupus
15 erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, 2018.
- 16 MATTEY, D. L. et al. Association of polymorphism in the transforming growth factor
17 {beta}1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis. **Annals of**
18 **Rheumatic Disease**, n. 64, v. 8, p. 1190-4, 2005.
- 19 MIYARA, M.; ITO, Y.; SAKAGUCHI, S. TREG-cell therapies for autoimmune
20 rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 9, p. 543–551, 2014.
- 21 MOK, C. C. Calcineurin inhibitors in systemic lupus erythematosus. **Best Practice**
22 **and Research: Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 429–438, 2017.
- 23 MOK, C.C.; LAI, K.N. Mycophenolate mofetil in lupus glomerulonephritis. **Am J**
24 **Kidney Dis**, v. 40, p. 447-457, 2002.
- 25 MORRIS, D. L. et al. MHC associations with clinical and autoantibody manifestations
26 in European SLE. **Genes and Immunity**, v. 15, n. 4, p. 210–217, 2014.
- 27 MOULTON, V. R. et al. Cellular Perspective. v. 23, n. 7, p. 615–635, 2018.
- 28 OATES, J. C. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus.
29 **Autoimmunity**, v. 43, n. 1, p. 56–63, 2010.
- 30 OBERMOSER, G.; SONTHEIMER, R. D.; ZELGER, B. Overview of common, rare
31 and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological
32 correlates. **Lupus**, v. 19, n. 9, p. 1050–1070, 2010.

- 1 OHL, K.; TENBROCK, K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus.
2 **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 2, p. 344–355, 2015.
- 3 OHTSUKA, K. et al. The relationship between defects in lymphocyte production of
4 transforming growth factor-beta1 in systemic lupus erythematosus and disease
5 activity or severity. **Lupus**, v. 8, n. 2, p. 90–94, 1999.
- 6 OWEN, C. J. et al. Genetic association studies of the FOXP3 gene in Graves'
7 disease and autoimmune Addison's disease in the United Kingdom population.
8 **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 37, n. 1, p. 97–104, 2006.
- 9 PANDIYAN, P. et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine
10 deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺T cells. **Nature Immunology**, v. 8,
11 n. 12, p. 1353-1362, 2007.
- 12 PARADOWSKA-GORYCKA, A. et al. Genetic polymorphisms of Foxp3 in patients
13 with rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 42, n. 2, p. 170–180, 2015.
- 14 PARKS, C. G. et al. Understanding the role of environmental factors in the
15 development of systemic lupus erythematosus. **Best Practice and Research:
16 Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 306–320, 2017.
- 17 PEREIRA, L. M. S. et al. Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators
18 of immune homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, p. 1–24, 2017.
- 19 PETRI, M. et al. Definition, incidence, and clinical description of flare in systemic
20 lupus erythematosus: a prospective cohort study. **Arthritis Rheumatism**, v. 34, p.
21 937–944, 1991.
- 22 PETRI, M. et al. Derivation and validation of the systemic lupus international
23 collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis
24 and Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2677–2686, 2012.
- 25 PISETSKY, D. S. Systemic lupus erythematosus. A. Epidemiology, pathology [SEP] and
26 pathogenesis. In: Klippel JH, ed. **Primer on the rheumatic diseases**, [SEP] 11th ed.
27 Georgia, USA: Arthritis Foundation, 1997, p. 246–51
- 28 RENAU, A. I.; ISENBERG, D. A. Male versus female lupus: A comparison of
29 ethnicity, clinical features, serology and outcome over a 30 year period. **Lupus**, v. 21,
30 n. 10, p. 1041–1048, 2012.
- 31 REZAEI, A. et al. Lack of association between interleukin-10, transforming growth
32 factor-beta gene polymorphisms and juvenile-onset systemic lupus erythematosus.
33 **Clinical Rheumatology**, v. 34, n. 6, p. 1059-1064, 2015.
- 34 RIBERO, S. et al. The Cutaneous Spectrum of Lupus Erythematosus. **Clinical**

- 1 **Reviews in Allergy and Immunology**, v. 53, n. 3, p. 291–305, 2017.
- 2 ROTHFIELD, N.; SONTHEIMER, R. D.; BERNSTEIN, M. Lupus erythematosus:
3 systemic and cutaneous manifestations. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 5, p. 348–
4 362, 2006.
- 5 RUIZ-IRASTORZA, G. et al. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in
6 systemic lupus erythematosus: A systematic review. **Annals of the Rheumatic**
7 **Diseases**, v. 69, n. 1, p. 20–28, 2010.
- 8 SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5,
9 p. 775–787, 2008.
- 10 SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system.
11 **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 7, p. 490–500, 2010.
- 12 SAMOTIJ, D.; REICH, A. Biologics in the treatment of lupus erythematosus: A critical
13 literature review. **BioMed Research International**, v. 2019, n. Dc, 2019.
- 14 SANJABI, B.; OH, S.A.; LI, M. O. Regulation of the Immune Response by TGF- β :
15 From Conception to Autoimmunity and Infection. **Cold Spring Harb Perspect Biol**,
16 v. 9, 2017.
- 17 SAYED, S. K. et al. Single nucleotide polymorphism T869C of transforming growth
18 factor-beta 1 gene and systemic lupus erythematosus: association with disease
19 susceptibility and lupus nephritis. **Egyptian Journal Immunology**, v.1, n. 2, p. 9-21,
20 2014.
- 21 SCALAPINO, K. J. et al. Suppression of Disease in New Zealand Black/New Zealand
22 White Lupus-Prone Mice by Adoptive Transfer of Ex Vivo Expanded Regulatory T
23 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1451–1459, 2006.
- 24 SCHEFFOLD, A.; MURPHY, K. M.; HÖFER, T. Competition for cytokines: Treg cells
25 take all. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1285–1287, 2007.
- 26 SCHMIDT, A. et al. Analysis of FOXP3+ regulatory T cell subpopulations in
27 peripheral blood and tissue of patients with systemic lupus erythematosus.
28 **Immunologic Research**, v. 65, n. 2, p. 551–563, 2017.
- 29 SCHOTTE, H. et al. The transforming growth factor-b1 gene polymorphism (G915C)
30 is not associated with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 12, p. 86-92, 2003.
- 31 SCHRIJVER, H. M. et al. Gender-related association between the TGFB1+869
32 polymorphism and multiple sclerosis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, v.
33 24, n. 9, p:536-42, 2004.

- 1 SELLA, A. L. B. G. **Polimorfismo genético do *FOXP3* -3279 c/a (rs3761548) e sua**
2 **associação com níveis plasmáticos de citocinas, atividade e prognóstico da**
3 **artrite reumatóide**. 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e
4 Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2019.
- 5 SIE, M.P.S. et al. TGF- β 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and
6 stroke: the Rotterdam study. **Stroke**, v.37, p. 2667-71, 2006.
- 7 SLATTERY, M. L.; HERRICK, J.S.; LUNDGREEN, A.; WOLFF, R.K. Genetic
8 variation in the TGF- β signaling pathway and colon and rectal cancer risk. **Cancer**
9 **Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 20, p. 57-69, 2011.
- 10 SOJKA, D. K.; HUANG, Y. H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T-cell
11 suppression - A diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, n. 1, p.
12 13–22, 2008.
- 13 STEPHENS. M.; SCHEET. P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in
14 haplotype inference and missing-data imputation. **American Journal of Human**
15 **Genetics**, v. 76, p. 449–462, 2005.
- 16 STEPHENS. M.; SMITH. N.J.; DONNELLY. P. A new statistical method for haplotype
17 reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, v. 68,
18 p.978–989, 2001.
- 19 STOHL, W. Inhibition of B cell activating factor (BAFF) in the management of
20 systemic lupus erythematosus (SLE). **Expert Review of Clinical Immunology**, v.
21 13, n. 6, p. 623–633, 2017.
- 22 STROUD, J. C. et al. Structure of the forkhead domain of FOXP3 bound to DNA.
23 **Structure**, v. 14, n. 1, p. 159–166, 2006.
- 24 SU, D. et al. Roles of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of
25 SLE. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- 26 SUGIYAMA, H. et al. Dysfunctional Blood and Target Tissue CD4 + CD25 high
27 Regulatory T Cells in Psoriasis: Mechanism Underlying Unrestrained Pathogenic
28 Effector T Cell Proliferation . **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 1, p. 164–173,
29 2005.
- 30 SUI, M. et al. Simultaneous positivity for anti-DNA, anti-nucleosome and anti-histone
31 antibodies is a marker for more severe lupus nephritis. **J Clin Immunol**, v. 33, p. 378-
32 387, 2013.
- 33 TAO, J. H. et al. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases.
34 **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 328–339, 2017.
- 35 TERUEL, M.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. The genetic basis of systemic lupus

- 1 erythematosus: What are the risk factors and what have we learned. **Journal of**
2 **Autoimmunity**, v. 74, p. 161–175, 2016.
- 3 TSOKOS, G. C. et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus
4 erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 12, p. 716–730, 2016.
- 5 TZAKAS, P. et al. Transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and peak bone mass:
6 association between intragenic polymorphisms and quantitative ultrasound of the
7 heel. *BMC Musculoskeletal Disorders*, Jun 14;6:29, 2005.
- 8 VALENCIA, X. et al. Deficient CD4 + CD25 high T regulatory cell function in patients
9 with active systemic lupus erythematosus . **The Journal of Immunology**, v. 178, n.
10 4, p. 2579–2588, 2007.
- 11 VARGAS-ROJAS, M. I. et al. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells
12 are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance.
13 **Lupus**, v. 17, n. 4, p. 289–294, 2008.
- 14 VIGLIETTA, V. et al. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T
15 cells in patients with multiple sclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199,
16 n. 7, p. 971–979, 2004.
- 17 WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted
18 owing to attenuated Foxp3 expression. **Nature**, v. 445, n. 7129, p. 766–770, 2007.
- 19 WANG, B. et al. Transforming growth factor beta 1 gene polymorphism in Japanese
20 patients with systemic lupus erythematosus. **Kobe Journal of Medicine Sciences**,
21 v. 53, n. 1, p. 15-23, 2007.
- 22 WEENING, J. J. et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus
23 erythematosus revisited. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n.
24 2, p. 241–250, 2004.
- 25 WEIGERT, O. et al. CD4+Foxp3+ regulatory T cells prolong drug-induced disease
26 remission in (NZBxNZW) F1 lupus mice. **Arthritis Research and Therapy**, v. 15, n.
27 1, p. R35, 2013.
- 28 WONG, J.M.; ESDAILE, J.M. Methotrexate in systemic lupus erythematosus. **Lupus**,
29 v.14, p.101-105, 2005.
- 30 XU J. et al. Association of 5 Well-Defined Polymorphisms in the Gene Encoding
31 Transforming Growth Factor- 1With Coronary Artery Disease Among Chinese
32 Patients With Hypertension. **Angiology**, v. 66, p. 1-7, 2014.
- 33 YOSHIMURA, A.; WAKABAYASHI, Y.; MORI, T. Cellular and molecular basis for the
34 regulation of inflammation by TGF- β . **Journal of Biochemistry**, v. 147, p. 781–792,
35 2010.

- 1 ZHANG, L. et al. Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic
- 2 rhinitis in a Chinese population. **Human Immunology**, v. 70, n. 11, p. 930–934,
- 3 2009.

- 4 ZHARKOVA, O. et al. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus
- 5 erythematosus. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 56, n. 1, p. i55–i66, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa:

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

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná,”** realizada no “Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL), Londrina, Paraná”. O objetivo da pesquisa é “determinar se existe associação entre fatores genéticos do indivíduo e a chance de desenvolver LES e se existe associação com o quadro clínico da doença”. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: no momento da entrada no projeto de pesquisa, será realizada uma avaliação clínica e coleta de 20mL 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 NL.

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 contatar: **Professora Dra. Andréa Name Colado Simão, no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UEL, fone 43-3371-2321, e-mail: deianame@yahoo.com.br**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490.

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

Londrina, _____ de _____ de 2018.

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andréa 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.

APÊNDICE B

Ficha de avaliação de pacientes e controles.

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>NL</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 |
| | | | | |

ANEXOS

ANEXO A

Critérios para classificação do LES (EULAR/CAR 2019).

| Critério de Entrada | | | |
|--|------------------|---|--------|
| Fatores antinucleares (FAN) com um título $\geq 1:80$ nas células HEp-2 ou um teste positivo equivalente (sempre) | | | |
| ▼ | | | |
| Se ausente, não classifique como LES Se houver, aplique critérios aditivos | | | |
| ▼ | | | |
| <p>Critérios aditivos</p> <p>Não conte um critério se houver uma explicação mais provável que o LES. A ocorrência de um critério em pelo menos uma ocasião é suficiente. A classificação do LES requer pelo menos um critério clínico e ≥ 10 pontos. Os critérios não precisam ocorrer simultaneamente. Dentro de cada domínio, apenas o critério ponderado mais alto é contado para a pontuação total§.</p> | | | |
| Domínios e critérios clínicos | Peso | Domínios e critérios de imunologia | Peso |
| <i>Constitucional</i> Febre | 2 | <i>Anticorpos antifosfolípidos</i> Anticorpos anti-cardiolipina OU Anticorpos anti- $\beta 2$ GP1 OU Anticoagulante do lúpus | 2 |
| <i>Hematológico</i> Leucopenia Trombocitopenia Hemólise autoimune | 3 4 4 | <i>Proteínas de complemento</i> C3 baixo OU C4 baixo C3 baixo E C4 baixo | 3 4 |
| <i>Neuropsiquiátrico</i> Delírio Psicose Apreensão | 2 3 5 | <i>Anticorpos específicos para LES</i> Anticorpo anti-dsDNA * OU Anticorpo anti-Smith | 6 |
| <i>Mucocutâneo</i> Alopecia sem cicatrizes Úlceras orais Lúpus cutâneo OU discoide subagudo Lúpus cutâneo agudo | 2 2 4 6 | | |
| <i>Serosal</i> Derrame pleural ou pericárdico Pericardite aguda | 5 6 | | |
| <i>Músculo-esquelético</i> Envolvimento conjunto | 6 | | |
| <i>Renal</i> Proteinúria $>0,5g/24h$ Biópsia renal Nefrite lúpica Classe II ou V Biópsia renal Nefrite lúpica classe III ou IV | 4 8 10 | | |
| Pontuação total: | | | |
| ▼ | | | |
| Classifique como Lúpus Eritematoso Sistêmico com uma pontuação de 10 ou mais se o critério de entrada for cumprido | | | |

ANEXO B

Índice de atividade da doença Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI)

A descrição deve estar presente na visita ou nos últimos 10 dias.

| Weight | SCORE | 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 2 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 cytoïd bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid, 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"/> | CVA | 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 | ≥ 2 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 | >5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause. |
| 4 | <input type="checkbox"/> | Proteinuria | >0.5 gram/24 hours |
| 4 | <input type="checkbox"/> | Pyuria | >5 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 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation. |
| 2 | <input type="checkbox"/> | Low complement | Decrease in CH50, C3, or C4 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 / x10 ⁹ /L, exclude drug causes. |
| 1 | <input type="checkbox"/> | Leukopenia | < 3,000 white blood cells / x10 ⁹ /L, exclude drug causes. |

TOTAL SCORE _____

ANEXO C

Parecer do Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da
Universidade Estadual de Londrina (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

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



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

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

CEP: 86.038-440

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

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

CEP: 86.038-440

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO D

Critérios de classificação do LES (CAR/SLICC 2012).

| Critérios Clínicos | Observações |
|---|--|
| Lúpus cutâneo agudo | Eritema malar, Fotossensibilidade, Eritema maculopapular do lúpus, Lúpus bolhoso, Necrose epidérmica tóxica, Lúpus cutâneo subagudo |
| Lúpus cutâneo crônico | Eritema discoide, Lúpus hipertrófico, Paniculite lúpica, Lúpus mucoso, Lúpus Eritematoso Tumido, Lúpus <i>chillblains</i> , Lúpus discóide/líquên plano sobreposição |
| Úlcera mucosa | Pálato ou nasal |
| Alopécia não cicatrizante | |
| Sinovite | Envolvendo 2 ou mais articulações |
| Serosite | Pleurite ou Pericardite |
| Renal | Proteinúria maior do que 0,5 grama em 24 horas ou cilindros hemáticos |
| Acometimento neurológico | Convulsão, psicose, mononeurite múltipla, mielite, neuropatia craniana ou periférica, estado confusional agudo. |
| Anemia hemolítica | |
| Leucopenia ou Linfopenia | Leucocitos < 4.000/mm ³ ou Linfócitos < 1.000/mm ³ |
| Trombocitopenia | < 100.000/mm ³ |
| Critérios Imunológicos | Observações |
| Anticorpo antinuclear (FAN) | |
| Anticorpo anti-DNA de cadeia dupla (Anti-dsDNA) | |
| Anticorpo Anti-Smith (Anti-Sm+) | |
| Anticorpos antifosfolípidos | Anticoagulante lúpico, Anticorpo anticardiolipina, anti beta 2 glicoproteína I |
| Complemento reduzido | C3, C4, CH50 |
| Coombs direto positivo | Na ausência de anemia hemolítica |