

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI (LIKA)

ANDRÉIA MARIA DA SILVA FONSECA

**“Estudo de polimorfismos de base única (SNPs) no gene STK17A
(*Serine/threonine protein kinase 17A*) em pacientes com Lúpus
Eritematoso Sistêmico”**

**Recife
2012**

ANDRÉIA MARIA DA SILVA FONSECA

**“Estudo de polimorfismos de base única (SNPs) no gene STK17A
(*Serine/threonine protein kinase 17A*) em pacientes com Lúpus
Eritematoso Sistêmico”**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Ciências Biológicas do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/CCB-UFPE) como um dos requisitos exigidos para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Crovella

Co-orientação: Prof^a Dr^a Paula Sandrin Garcia

Recife

Fonseca, Andréia Maria da Silva

Estudo de polimorfismos de base única (*Serine/threonine protein kinase 17 A*) em pacientes com Lúpus Erimatoso Sistêmico/ Andréia Maria da Silva Fonseca– Recife: O Autor, 2012.

61 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Sérgio Crovella

Coorientadora: Paula Sandrin Garcia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia Aplicada à Saúde, 2012.

Inclui bibliografia e apêndice

1. Lúpus Eritematoso sistêmico 2. Polimorfismo (genética) 3. PCR I. Crovella, Sérgio II. Garcia, Paula Sandrin III. Título

616.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-155



Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos nove dias do mês de março de dois mil e doze, às nove horas, no auditório do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, realizou-se a Defesa de Dissertação apresentada pela Mestranda **ANDREIA MARIA DA SILVA FONSECA**, intitulada: **“Estudo de polimorfismos de base única (SNPs) no gene STK17A9serine/threonine protein kinase 17^o em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”**. A Banca Examinadora foi homologada em 02 de março de dois mil e doze pela PROPESQ, tendo como membros titulares os Professores: **Sergio Crovella** (orientador), Doutor em Antropologia Molecular, pela Università degli Studi di Firenze, **Luiz Cláudio Arraes de Alencar**, Doutor em Infectologia, pela Universidade Federal de São Paulo, **Lucas André Cavalcanti Brandão**, Doutor em Biotecnologia em Saúde, pela Rede Nordeste de Biotecnologia; **Cíntia Renata Costa Rocha**, Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade de São Paulo e **Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**, Doutor em Ciências Biológicas (área de concentração Biotecnologia) pela Universidade Federal de Pernambuco, suplentes. O Prof. Sergio Crovella deu início à Sessão. Agradeceu pela presença de todos e convidou a Mestranda para fazer exposição de sua tese, que efetuou em trinta minutos. Continuando, o presidente solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar (1º examinador), Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão (2º examinador). Dando continuidade, a Banca se reuniu em sessão privada a fim de proceder a avaliação. A comissão Examinadora atribuiu a Andreia Maria da Silva Fonseca a seguinte menção: **“Aprovada com Restrições descritas no verso desta Ata”**. Face ao resultado a mesma terá 60 (sessenta) dias a contar da data da defesa para fazer as correções. Nada mais havendo a registrar, a sessão foi encerrada e para constar, eu Sergio Crovella (orientador do projeto) lavrei a presente ata que segue por mim assinada e pelos demais membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Sergio Crovella
Orientador/UFPE

Dr. Luiz Claudio Arraes de Alencar
1º examinadora

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão
2º Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sua presença constante em minha vida.

Ao meu orientador, a quem tenho como exemplo de vida e o considero como um pai.

À minha co-orientadora, por todas as contribuições que fez a minha vida acadêmica.

À minha mãe e irmãos pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amigos, Ronaldo Celerino (LIKA-UFPE), Jaqueline Azevedo (LIKA-UFPE), Lucas Brandão (LIKA-UFPE), Rafael Guimarães (LIKA-UFPE), Márcia Schneider (AGGEU-UFPE), Alsemo Kamada (LIKA-UFPE), Antonio Coelho (LIKA-UFPE), Priscila Serafim (LIKA-UFPE), Heidi Lacerda (LAB. CENTRAL-UFPE), Catarina Adobbatti (LIKA-UFPE), Nathália Alencar (LIKA-UFPE), e a todos do laboratório que se tornaram minha segunda família.

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune do tecido conectivo, que apresenta diversas manifestações clínicas e sorológicas. Embora sua causa seja desconhecida, sabe-se que o LES é uma doença multifatorial, no qual pacientes apresentam uma deficiência no reparo de quebras de dupla fita de DNA (DSBs), causada tanto por agentes endógenos quanto exógenos. O gene STK17A (Serina/Threonina quinase 17A) pode estar envolvido no desencadeamento da doença, uma vez que codifica uma proteína que participa do processo de reparo de DSBs e apoptose. Deficiência nesse processo pode induzir a produção de anticorpos anti ds-DNA e consequente deposição de imunocomplexos, causando inflamação nos tecidos. Neste estudo, foi investigada a associação de cinco polimorfismos de base única (SNPs) no gene STK17A com a susceptibilidade ao LES e as principais manifestações clínicas da doença. O grupo de estudo foi composto por 143 pacientes com LES e 177 indivíduos saudáveis como grupo controle. A genotipagem foi realizada pela metodologia de PCR em tempo real ABI7500HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando Probe Taqman SNP Genotyping Assay. As frequências alélicas e genótípicas foram calculadas através do programa Genotyper Transposer e avaliadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste exato de Fisher, juntamente com o programa R, versão 2.1.1 para verificar associação entre os SNPs testados e a susceptibilidade à doença. A distribuição haplotípica foi analisada através do programa SNPstat. A avaliação da associação dos alelos e genótipos dos SNPs com as manifestações clínicas e sorológicas da doença foi realizada pelo EpiInfo (versão 3.5.2) e teste exato de Fisher. Para ajustar os valores de p-values para testes múltiplos, foi aplicada a correção de Bonferroni. Foi observada diferença significativa quando comparados pacientes e controles após a estratificação para o sexo: O genótipo A/A do SNP rs10259269 se mostrou mais frequente nos controles (7.6%) do que nos pacientes (0,7%) conferindo proteção contra o desenvolvimento do LES no sexo feminino (OR = 0,09, p = 0,01). Quando analisada a distribuição dos haplótipos, foi encontrada associação significativa em pacientes com LES entre dois haplótipos: TGGTT e TAGTC (OR = 0,54, p = 0,01 e OR = 0,25, p = 9.04e-08, respectivamente) com efeito protetor contra o desenvolvimento da doença. Interessantemente, após estratificação para etnia (descendentes europeus) e sexo (feminino) o haplótipo TAGTC novamente conferiu proteção ao LES (OR = 0,25, p = 2.30e-06 e OR = 0,41, p = 0,01 respectivamente). Uma associação significativa foi observada entre o genótipo A/G para o SNP rs7802995 com manifestação cutânea em pacientes com LES (OR = 3,44, p = 0,004). Finalmente, depois da estratificação dos pacientes para etnia, foi encontrada uma associação significativa com a alteração sorológica anti ds-DNA na proteção de descendentes de Africanos (OR = 0,11, p = 0,009). Não foi observada associação entre o sexo e as manifestações clínicas/laboratoriais. Em síntese, concluímos que polimorfismos no gene STK17A podem estar envolvidos no desenvolvimento do LES, entretanto, outros estudos de réplica avaliando o efeito funcional desses SNPs na expressão e/ou atividade da proteína são necessários para confirmar o seu papel na susceptibilidade/proteção à doença.

Palavras- chave: DRAK1. Susceptibilidade. PCR em tempo real.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease of the connective tissue, which presents diverse clinical and serological manifestations. Although its cause is unknown, it is known that SLE is a multifactorial disease, in which patients have a deficiency in the repair of double strand breaks in DNA (DSBs), caused by both endogenous and exogenous agents. The gene STK17A (Serine / Threonine kinase 17A) may be involved in the onset of the disease since it encodes a protein which participates in the repair of DSBs and apoptosis. Deficiency in this process can induce the production of anti-ds DNA and consequent deposition of immune complexes, leading to inflammation in tissues. This study investigated the association of five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in gene STK17A with the susceptibility to SLE and the clinical manifestations of the disease. The study group consisted of 143 SLE patients and 177 healthy individuals as control group. Genotyping was performed by the methodology of real-time PCR ABI7500HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Taqman SNP Genotyping Assay Probe. The allelic and genotypic frequencies were calculated using the program Genotyper Transposer and evaluated for Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical analyzes were performed by Fisher's exact test, along with the program R, version 2.1.1 to assess the association between the tested SNPs and disease susceptibility. The haplotype distribution was analyzed using the program SNPstat. The evaluation of the association of alleles and genotypes of the SNPs with the clinical and serological manifestations of the disease was performed using EpiInfo (version 3.5.2) and Fisher's exact test. To adjust the p-values for multiple testing, was applied a Bonferroni correction. Significant difference was observed when comparing patients and controls after stratification for sex: genotype A/A SNP rs10259269 was more frequent in controls (7.6%) than in patients (0.7%) providing protection against the development of SLE in females (OR = 0.09, $p = 0.01$). When we analyzed the distribution of haplotypes, significant association was found in SLE patients between two haplotypes: TGGTT and TAGTC (OR = 0.54, $p = 0.01$ and OR = 0.25, $p = 9.04e-08$, respectively) with protective effect against disease development. Interestingly, after stratification by ethnicity (European descent) and sex (female) the haplotype TAGTC conferred protection again to SLE (OR = 0.25, $p = 2.30e-06$ and OR = 0.41, $p = 0.01$, respectively). A significant association was observed between the genotype A/G SNP rs7802995 with cutaneous manifestation in SLE patients (OR = 3.44, $p = 0.004$). Finally, after stratification of patients for ethnicity, was found a significant association with serological manifestation anti-ds DNA in the protection of African descent (OR = 0.11, $p = 0.009$). There was no association between sex and clinical / laboratory manifestation. In conclusion, the STK17A gene polymorphisms may be involved with the development of SLE, however, other studies of replicates evaluating functional effect of these SNPs in the expression and/or activity of protein are needed to confirm its role in susceptibility / protection disease.

Keywords: DRAK1. Susceptibility and PCR real time.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Manifestações Clínicas do LES.....	17
Figura 2: Comprometimento cutâneo em forma de "asas de borboleta"	17
Figura 3: Recombinação de DNA não homóloga (NHEJ).....	23
Figura 4: Etapas da PCR em tempo real.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Histórico do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	13
Tabela 2: Os 11 critérios estabelecidos pela American College of Rheumatology (ACR)...	19
Tabela 3: Genes associados ao Lúpus Eritematoso Sistêmico e suas respectivas funções.	20

LISTA DE SIGLA

PORTUGUÊS	INGLÊS
ACR - Colégio Americano de Reumatologia	American College of Rheumatology
BLyS - Estimulador de linfócitos B	B-lymphocyte Stimulator
cDNA - DNA complementar	Complementary DNA
Ct - Ciclo Threshold	Cycle Threshold
DC - Célula Dendrítica	Dendritic cell
DNA PK - DNA proteína quinase dependente	DNA dependent protein kinase
DNA - Ácido Desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
DSBs - Quebras de dupla fita de DNA	Double strand breaks
dsDNA - Dupla cadeia	Double-stranded
EBV - Vírus Epstein Barr	Virus Epstein Barr
FASE LOG - Fase logarítmica	Log phase
HLA - Antígeno Leucocitário Humano	Human Leukocyte Antigen
HR - Recombinação Homóloga	Homologous recombination
IL - Interleucina	Interleukin
IRF5 – Interferon regulador do Fator-5	Interferon Regulatory Factor 5
LD - Desequilíbrio de Ligação	Linkage disequilibrium
LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico	Systemic Lupus Erythematosus
LIG4 - DNA Ligase IV	DNA Ligase IV
LT - Linfócitos	Lymphocytes
MHC - Complexo principal de Histocompatibilidade	Major histocompatibility complex
NHEJ - Recombinação não homóloga	Non homologous recombination
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase	Polymerase Chain Reaction
RNA - Ácido Ribonucleico	Ribonucleic acid
SNPs - Polimorfismos de único nucleotídeo	Single nucleotide polymorphisms
STK17A - Serina/Threonina quinase 17A	Serine/Threonine Kinase 17A
SSB - Quebras de fita simples	Single-stranded break
Treg - Células T regulatórias	Regulatory T cells
TCR - Receptores de células T	T cell receptors

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA E AUTOIMUNIDADE	12
1.2 HISTÓRICO DO LES.....	12
1.2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico	13
1.2.1.1 <i>Epidemiologia</i>	13
1.2.1.2 <i>Fatores Ambientais Imunológicos e Hormonais</i>	14
1.2.1.3 <i>Patogênese</i>	16
1.2.1.4 <i>Manifestações Clínicas</i>	17
1.2.1.5 <i>Diagnóstico</i>	19
1.3 LES E SUA BASE GENÉTICA	19
1.3.1 O gene STK17A	23
1.3.1.1 <i>Regulador de Apoptose</i>	23
1.3.1.2 <i>Reparo das DSBs</i>	23
1.4 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPS)	25
1.4.1 PCR em tempo real na detecção de SNPs	26
1.5 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVOS GERAIS	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
APÊNDICE A - MANUSCRITO “STK17A (Serine/threonine protein kinase 17A) gene polymorphisms are associated with Systemic Lupus Erythematosus and cutaneous manifestations ”	39

INTRODUÇÃO

O Lúpus eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica autoimune, heterogênea podendo atingir uma grande variedade de órgãos e sistemas, entre eles o articular, cutâneo, cardiovascular, pulmonar, renal, neurológico, hematológico e imunológico em qualquer fase da doença. A doença é mais frequente em mulheres na idade reprodutiva numa proporção de 9:1, todavia pode ocorrer tanto em idosos como em recém-nascidos. A etiologia do LES ainda não está totalmente elucidada, entretanto, diversos estudos sugerem o envolvimento de fatores genéticos, ambientais e hormonais na perda da tolerância e no consequente desencadeamento da doença. A fisiopatologia do LES baseia-se na formação de auto-anticorpos, sendo então depositados em forma de imunocomplexos em tecidos e órgãos, iniciando assim, uma atividade inflamatória causando lesões nos mesmos. Diversos auto-anticorpos são produzidos sendo dirigidos contra os diferentes constituintes celulares como o DNA, fosfolipídios, histonas e ribonucleoproteína.

A base genética do LES é complexa, devido a sua natureza de baixa penetrância, diversos genes contribuem com uma pequena parcela para determinar a susceptibilidade à doença. Dessa forma, diversos estudos tentam identificar os genes que predisõem à doença. A partir de estudo desenvolvido por SANDRIN-GARCIA et al (2009) que avaliaram o perfil de expressão gênica de pacientes com LES nas fases ativa e inativa da doença, vários genes mostraram-se diferencialmente expressos. Oito genes foram considerados candidatos a estarem envolvidos na patogênese da doença, dentre eles, o gene STK17A (Serina/Threonina quinase 17A) envolvido em mecanismos de reparo de quebras de dupla fita de DNA (DSBs) e apoptose.

Sabe-se que pacientes com LES apresentam sistema de reparo de DNA ineficiente, o que pode causar acúmulo de células danificadas e consequentemente aumento na taxa de apoptose. Uma vez que a patogênese do LES ainda não é bem estabelecida, consideramos que esse gene pode ser forte candidato a estar envolvido na susceptibilidade à doença. Assim, este estudo teve o objetivo de investigar a associação de polimorfismos de base única (SNPs) no gene STK17A com a susceptibilidade ao LES e suas manifestações clínicas.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA E AUTOIMUNIDADE

O sistema imune é uma complexa “rede”, composta de diversos constituintes celulares, mediadores, receptores e vias bioquímicas entre outros componentes, capaz de interagir com os diferentes estímulos antigênicos (CRUVINEL et al., 2008). A capacidade para reconhecer entre antígenos próprios (“*self*”) e não próprios (“*non-self*”) é de extrema importância para manter a tolerância imunológica. Os mecanismos de tolerância imunológica são divididos em tolerância central e periférica, onde participam células imunocompetentes B e T (SOUZA et al., 2010).

A tolerância central ocorre no timo com as células T, que são originadas da medula óssea. Os timócitos após passarem pelo processo de proliferação, diferenciação celular e criação do repertório de receptores de linfócitos (TCR, CD3, CD4 e CD8) que leva a sua diferenciação, são então submetidos a dois processos seletivos diferentes: seleção positiva e, posteriormente, negativa. Esses processos são responsáveis pela eliminação de LT auto-reativos, todavia essa barreira não é suficiente para eliminar todas as células T auto-reativas, tendo seu consequente escape para a periferia. A tolerância periférica, por sua vez, através de diferentes e redundantes mecanismos tais como: ignorância imunológica, anergia ou morte celular por apoptose, além da atuação de células T regulatórias (“*T_{regs}*”), promove a inibição da ativação e expansão de linfócitos auto-reativos nos tecidos periféricos (SAKAGUCHI et al., 2000; SHEVACH et al., 2000; SAKAGUCHI et al., 2004). A quebra desses processos pode gerar um potencial para autoimunidade (CRUVINEL et al., 2008).

As doenças autoimunes atingem cerca de 3-5% da população mundial, tendo sua origem na complexa interação entre fatores ambientais e fatores intrínsecos ao organismo, tais como predisposição genética, que geralmente está associada a polimorfismos de genes de histocompatibilidade ou da imunidade inata/adquirida, além de outras alterações como hormonais e redução no controle imuno-regulatório (SOUZA et al., 2010).

1.2 HISTÓRICO DO LES

A palavra lúpus é originada devido à semelhança das lesões cutâneas em forma de “asas de borboleta”, que cobriam o nariz e a bochecha de vários pacientes, com as manchas existentes na face dos lobos (BLOTZER et al., 1983). Em 1833, Pierre Cazenave adicionou

Eritematoso ao nome, devido às características destrutivas ou ulcerativas da doença (CAZENAVE et al., 1852; WALLACE et al., 1999). Enquanto em 1895, o médico Canadense Sir Osler caracterizou melhor o envolvimento de várias partes do corpo na doença e incluiu a palavra Sistêmico ao nome, que passou a ser chamada de Lúpus Eritematoso Sistêmico (OSLER et al., 1895; OSLER et al., 1904; OSLER et al., 1900). Osler deu uma grande contribuição no conhecimento de alguns aspectos do LES, tais como remissão e exacerbação, além da presença da doença de pele como um dos sintomas da doença sistêmica (OSLER et al., 1904). Apartir de então grandes progressos tem sido feitos quanto ao estudo, diagnóstico e tratamento do LES. A tabela 1 mostra um breve histórico.

Tabela 1 Histórico do LES.

HISTÓRICO	
916 ac	Primeira descrição escrita da cicatrização de Eraclius, Bishop de Liège, no santuário de St. Martin em Tours.
Início do século 19	O termo Lúpus foi reservado para doenças com características destrutivas ou ulcerativas que apareciam na face dos pacientes.
1833	Primeira descrição do termo Lúpus Eritematoso.
1846	"rash borboleta" termo usado por Ferdinand Von Hebra.
1880	"asa de morcego" termo usado por Jonathon Hutchinson, tendo observado pela primeira vez a fotossensibilidade nos pacientes com LES.
1895	Sir William Osler reconhece a natureza sistêmica da doença.
1923	Lesões cardíacas são descritas por Libman e Sacks.
1935	Doença renal e glomerulonefrite relatadas por Baehr.
1948	Descoberta das células LE por Hargraves, definindo o cenário para estudo de sorologia em pacientes com LES.
1959	Estudos em modelos murinos, apartir dos achados de uma doença semelhante ao LES em camundongos NZB /W.
1976	Apartir da descrição original da agregação familiar de LES possibilitou estudos genômicos na identificação de diversos genes envolvidos na susceptibilidade ao Lúpus

Fonte: SCOFIELD et al., 2009.

1.2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

1.2.1.1 Epidemiologia

A incidência do LES varia de acordo com as características da população estudada como a região, étnia, sexo, grupos etários, período de tempo estudado, além de mudanças nos critérios diagnósticos da doença. O diagnóstico de casos menos graves, como consequência do maior conhecimento da doença e o auxílio de testes laboratoriais tem contribuído para o

aumento da prevalência do LES e da taxa de sobrevida. Em 1954, 78% dos pacientes sobreviviam ao primeiro ano da doença e apenas 52% chegavam ao quarto ano (HARVEY et al., 1954; MERREL et al., 1955), enquanto na década de 90, a taxa de sobrevida de pacientes variou de 95% aos cinco anos, 90% aos dez anos e de 79% a 83% aos quinze anos (ABU-SHAKRA et al., 1995; GRIPENBERG et al., 1991). Em 2004, a sobrevida em vinte anos era próxima de 70% (BEZERRA et al., 2004)

Atualmente, a maioria dos dados epidemiológicos sobre o LES é de países desenvolvidos como Estados Unidos, Inglaterra e países nórdicos. As taxas de incidência do LES variam aproximadamente de 1 a 10 a cada 100.000 pessoas por ano, enquanto a prevalência em geral varia de 20 a 150 a cada 100.00 pessoas (NALEWAY et al., 2005; STAHL-HALLENGREN et al., 2000; PONS-ESTEL et al., 2010). A doença afeta predominantemente mulheres, com uma taxa que varia de 4 a 13 mulheres para cada homem afetado. Quanto à etnia, indivíduos de qualquer grupo étnico podem ser afetados, sendo mais comum em indivíduos da raça negra e, a seguir, em portugueses, espanhóis, italianos, asiáticos e polinésios (PETRY, 2002).

No Brasil, no entanto, existem apenas dois estudos epidemiológicos: O primeiro foi desenvolvido na cidade de Natal/RN, em que foi encontrada uma das maiores incidências de LES já descritas na literatura, sendo de 8,7 casos por 100.000 habitantes/ano (VILAR et al., 2002), enquanto o estudo realizado em Cascavel/PR mostrou uma incidência menor, de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano, sendo este último mais similar aos dados epidemiológicos de países desenvolvidos. Sugere-se que essa diferença seja devido à posição geográfica e composição étnica da região (NAKASHIMA et al., 2011).

1.2.1.2 Fatores Ambientais Imunológicos e Hormonais.

Os mecanismos envolvidos no desencadeamento da doença ainda não estão completamente elucidados, no entanto, sabe-se que alguns fatores têm uma importante participação nesse processo. Entre esses estão a exposição à luz ultravioleta ou produtos químicos (aminas aromáticas, hidrazinas, metais pesados, etc) (KONO et al., 2000). Diversos estudos mostram a associação do tabagismo e seus componentes (nicotina) ao fator de risco e atividade da doença, propõe-se que esses componentes induzam mutações em genes imunoreguladores aumentando assim a susceptibilidade ao LES. O fator de risco induzido

pelo tabagismo só diminui com anos após a interrupção do hábito de fumar (GHAUSSY et al., 2001; FREEMER et al., 2005; COSTENBADER et al., 2005).

A infecção por vírus como o Epstein Barr (EBV) tem sido considerado como um dos fatores importantes no desencadeamento da doença, tendo em vista que se utiliza de mecanismos como mimetismo molecular para infectar as células humanas, podendo levar a reação cruzada de anticorpos virais contra constituintes celulares humanos, sendo evidenciado através de estudos que mostram a presença de altos títulos de anticorpos EBV em pacientes com LES, além da constatação de que a infecção pelo EBV antecede o aparecimento das alterações autoimunes, que ocorrem no LES (VERDOLINI et al. 2002; DROR et al. 1998). Apesar da infecção por EBV acometer mais de 90% da população mundial, o vírus podem emergir do seu período de latência em quantidade suficiente para causar estimulação imune (KATZ et al. 2001).

Outros agentes também têm sido encontrados com frequência entre os pacientes como: as bactérias gram negativas, fungos e agentes oportunistas, em que a maior frequência e gravidade das infecções podem ser explicadas devido à diminuição dos linfócitos (CD4+) e com isso redução da capacidade fagocítica, além da diminuição do complemento sérico nesses indivíduos (FERREIRA et al., 2008).

A razão da maior prevalência do LES no sexo feminino ainda não está totalmente esclarecida, todavia é sabido que fatores relacionados ao sexo, especialmente fatores genéticos e endocrinológicos estejam envolvidos nesse processo (TISKIEVICZ et al., 2005). Estudos mostraram o importante papel da prolactina na patogênese do LES, através da análise dos índices de prolactina sérica, sendo observado uma frequência aumentada de 20% a 30%, variando de 8% a 69,7% dependendo da atividade da doença em pacientes com LES (PACILIO et al., 2001; WALKER et al., 2000), enquanto que a prevalência de hiperprolactinemia na população geral é menor que 5% (BATRINOS et al., 1992.). Estudo em modelos animais, com um agonista dopaminérgico que inibe a produção de prolactina teve efeito sobre ação dos linfócitos B, tendo sido evidenciado a partir da consequente diminuição do aparecimento de anticorpo anti-DNA de dupla fita, prolongando a sobrevida vida dos indivíduos (PEEVA et al., 2004).

1.2.1.3 Patogênese

O LES apresenta como uma das principais características, o desenvolvimento de auto-anticorpos, que precede de anos do início dos sintomas clínicos da doença (ARBUCKLE et al., 2003). Embora o papel dessas imunoglobulinas na patogênese da doença ainda não esteja totalmente elucidado, sabe-se que esses autoanticorpos são formados em resposta a quebra de mecanismos de tolerância e consequente hiperatividade de linfócitos B e T, sendo então dirigidos contra proteínas citoplasmáticas, moléculas de superfície celular e constituintes nucleares (RUS et al., 2002; CASOLI et al., 2001).

Os auto-anticorpos apresentam como característica: a especificidade de ligação com diferentes autoantígenos, prevalência e patogenicidade (SHERER et al., 2004). Os anticorpos antinucleares são os mais característicos da doença, estando presentes em mais de 95% dos casos, entre esses se destacam, os anticorpos anti-DNA fita dupla (ds-DNA) e anti-Sm. Os anticorpos anti-Sm reagem com pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP), enquanto que os anticorpos anti-DNA se ligam a determinadas sequências conservadas e amplamente presentes no DNA, além de ter sido associados com a severidade da doença (VAN et al., 1997).

A heterogeneidade de manifestações clínicas do LES deve-se em parte à diversidade de autoanticorpos dirigidos contra os diferentes autoantígenos, formando imunocomplexos e promovendo a sua deposição nos tecidos e consequente inflamação dos mesmos (SHERER et al., 2004). Dessa forma, os complexos imunitários contendo anticorpos anti-DNA, por exemplo, têm uma probabilidade aumentada de acumular-se nos rins (TSOKOS et al., 2011), além de sua ligação com receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) que são amplamente distribuídos por todo o cérebro, ligando-se às células neuronais e destruindo-as (LEE et al., 2009). Os anticorpos anti-Ro têm sido associados ao lúpus neonatal, tendo em vista que ele age alterando a função de miócitos e células do sistema de condução e promovendo o bloqueio cardíaco congênito (LEE et al., 2009).

Segundo TSOKOS et al. (2011), futuramente será possível prever o aparecimento de características clínicas do LES, através do acompanhamento e avaliação clínica do desenvolvimento de vários auto-anticorpos da doença.

1.2.1.4 Manifestações Clínicas

O Lúpus Eritematoso Sistêmico evolui com períodos de atividade e remissão e a maioria dos sintomas iniciais dos pacientes com LES são anemia, mal estar, fadiga, perda de peso e febre (MEINÃO et al., 2008). O LES atinge diversos órgãos e sistemas tais como: a pele, o coração, as articulações, os pulmões, os vasos sanguíneos, o fígado, os rins e o sistema nervoso, além de diversas manifestações em regiões como a boca, trato nasal e urinário (Figura 1), no qual o comprometimento pode ocorrer de forma simultânea ou sequencial. (SATO et al., 2000).

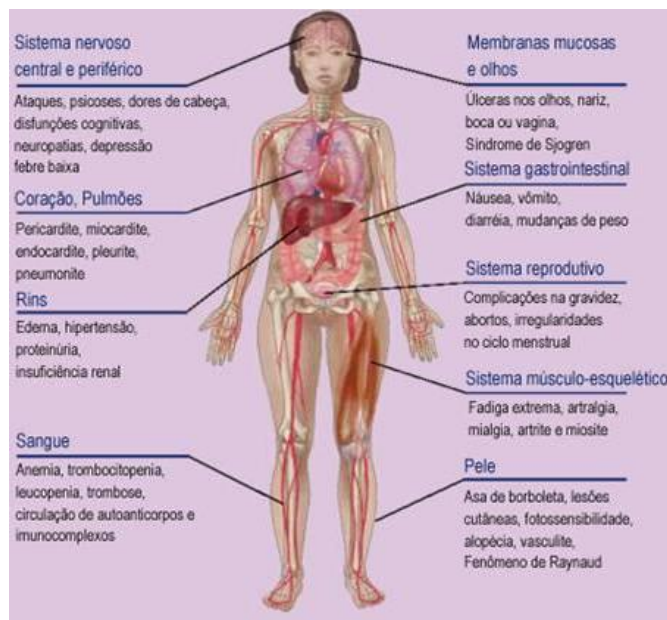


Figura 1 Manifestações clínicas do LES.
Fonte: (DRJEFFCHANDLER.COM)



Figura 2 Comprometimento cutâneo em forma de "asas de borboleta".
Fonte: (medinsolita.webnode.com)

O Comprometimento Cutâneo ocorre em cerca de 90% dos casos, ao longo da evolução da doença. Uma das principais características é a presença de lesões em forma de "asas de borboleta", que ocorrem em aproximadamente 50% dos casos, e é caracterizada por ter início agudo, ser do tipo eritematosa, com localização em regiões malares e dorso do nariz. Outras lesões agudas são as lesões eritemato-maculares, papulares ou máculo-papulares e as lesões bolhosas, localizadas geralmente em regiões expostas ao sol (Figura 2) (BERBERT et al., 2005).

As alterações articulares geralmente se apresentam com quadros de dores, rigidez, sinovites e artrites deformantes não erosivas, acometendo preferencialmente as articulações das mãos, punhos e joelhos, todavia, todas as articulações (grandes e pequenas) podem ser afetadas, sendo que raramente tem evolução crônica. A frequência da artrite lúpica varia de 69% a 95% dos casos (CAZNOCH CJ et al., 2006).

As manifestações hematológicas incluem anemia em até 50% dos casos, sendo normocrômica e normocítica. A anemia hemolítica auto-imune é encontrada apenas em 14% dos casos. Entre as outras alterações hematológicas destaca-se a plaquetopenia menor que $100.000 \text{ células/mm}^3$, a leucopenia menor que $4.000 \text{ leucócitos/mm}^3$ ou linfopenia menor $1.500 \text{ linfócitos/mm}^3$, sendo que a leucopenia e/ou linfopenia ocorrem em cerca de 50% dos casos, ao longo da evolução da doença (MEINÃO et al., 2008).

Quanto às manifestações cardíacas pode ocorrer inflamação de várias partes do coração, tais como pericardite, miocardite ou endocardite, na qual a miocardite clínica ocorre em aproximadamente 10% dos casos, outra característica é a presença de aterosclerose (ALVES et al., 1997). Entre as manifestações que acometem os pulmões e pleura destacam-se a pneumonite aguda, pneumopatia crônica fibrosante e hipertensão pulmonar, sendo essa última gerada devido à vasoconstrição, pela presença de microtrombos e secundária à síndrome do anticorpo antifosfolípideo (PETRI et al., 2004; LAWRENCE et al., 2004).

O envolvimento renal associado ao LES é comum. A maioria dos pacientes lúpicos apresentam no tecido renal depósitos de imunocomplexos, visualizados através da microscopia de imunofluorescência e eletrônica, porém a doença renal se apresenta clinicamente em cerca de 30 a 65% dos pacientes (LAHITA et al., 2004). Entre as diferentes formas de nefrite lúpica, a glomerulonefrite proliferativa difusa é a de pior evolução, pois pode levar a quadros de insuficiência renal aguda, sendo geralmente indicadas terapias mais agressivas para pacientes com esse tipo de padrão morfológico. A presença de proteinúria é o

sinal mais comum da nefrite lúpica, cuja lesão predominante é glomerular, podendo em vários casos estar associado ao comprometimento túbulo-intersticial (ALVES et al., 1997).

Entre as diversas manifestações neurológicas, destaca-se: disfunção cognitiva, transtorno do humor, doenças cerebrovasculares, convulsões (20%), polineuropatias, distúrbios de ansiedade e distúrbios psiquiátricos em 15% dos casos (LAHITA et al., 2004).

1.2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico do LES é complicado, devido à heterogeneidade de características clínicas apresentadas pelos pacientes. Dessa forma, para o diagnóstico da doença são utilizados os 11 critérios estabelecidos pela “American College of Rheumatology” (ACR) (1997) que se baseia na associação de manifestações clínicas e laboratoriais, sendo que na presença de 3 a 4 dos 11 critérios, o diagnóstico do LES é confirmado (Tabela 2).

Tabela 2 Critérios estabelecidos pela American College of Rheumatology (ACR) 1997.

Critérios de pele:	1 - Erupção malar: Mancha “asa de borboleta” (vermelhidão característica no nariz e na face). 2 - Lesão discóide: Lesão eritematosa, infiltrada, que evolui com cicatriz atrófica e discromia (geralmente em áreas expostas ao sol). 3 - Fotossensibilidade: Lesões após raios ultravioletas A e B. 4 - Úlceras orais/ nasais: úlceras orais, usualmente indolores.
Critérios sistêmicos:	1 - Artrite: Inflamação de duas ou mais juntas periféricas, com dor, inchaço ou fluído. 2 - Serosite: Inflamação do revestimento do pulmão (pleura), e coração (pericárdio). 3 - Comprometimento renal: Proteinúria persistente ou cilindrúria anormal. 4 - Alterações neurológicas: Convulsões, psicose ou depressões.
Critérios laboratoriais:	1 - Alterações hematológicas: Anemia hemolítica (anemia causada por anticorpos contra células vermelhas) ou leucopenia (baixa contagem de células brancas) ou plaquetopenia (plaquetas). 2 - Alterações imunológicas: Anticorpo anti-DNA ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide (níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; teste positivo para anticoagulante lúpico ou teste falso positivo para sífilis). 3 - FAN positivo: Título anormal de anticorpo antinuclear.

Fonte: HOCHBERG, 1997.

1.3 LES E SUA BASE GENÉTICA

A genética do LES é complexa, havendo contribuição de vários genes que parecem atuar em conjunto e determinar a susceptibilidade à doença (VYSE & KOTZIN et al., 1998).

Estudos de concordância para LES em gêmeos monozigóticos e dizigóticos mostraram uma taxa de 25% contra 2%, sugerindo que o componente genético constitui um forte fator para predisposição à doença (SULLIVAN et al., 2000).

Segundo GATEVA et al (2009) apenas 8% da contribuição genética do LES é conhecida. Alguns dos loci previamente identificados para o LES incluem genes que codificam proteínas importantes da imunidade inata (MBL2), na sinalização de interferon (ITGAM, TNFAIP3, STAT4 e IRF5) (HOM et al., 2008; GRAHAM et al., 2008), além daqueles envolvidos na imunidade adaptativa e na produção de auto-anticorpos (HLA de classe II, BLK, PTPN22 e BANK1) (KOZYREV et al., 2004; HARLEY et al., 2008) . Alguns outros loci não têm qualquer função conhecida ou papel imunológico aparente, todavia tem o potencial para revelar novos mecanismos da doença como o gene PXX (HARLEY et al., 2008) (Tabela 3).

Tabela 3 Genes associados ao LES e suas respectivas funções.

GENES ASSOCIADOS AO LES	FUNÇÕES
<i>IRF5, STAT4, SPP1, IRAK1, TREX1, TNFAIP3, TNIP1, PRDM1, PHRF1, TYK2, SLC15A4, TLR8</i>	FUNÇÃO NAS CÉLULAS DENDRÍTICAS E NA SINALIZAÇÃO DE IFN
<i>PTPN22, TNFSF4, PDCD1, IL10, BCL6, IL16, TYK2, PRL, STAT4, RASGRP3</i>	SINALIZAÇÃO DE CÉLULAS T
<i>BANK1, BLK, LYN, BCL6, RASGRP3</i>	SINALIZAÇÃO DE CÉLULAS B
<i>ITGAM, C1QA, C2, C4A, C4B, FCGR2A, FCGR3A, FCGR3B, KLK1/3, KLRG1, KIR2DS4, MBL2</i>	PROCESSAMENTO DE IMUNOCOMPLEXOS E IMUNIDADE INATA
<i>CASP10, NMNAT2, PTTG1, MSH5, PTPRT, UBE2L3, ATG5, RASGRP3</i>	CICLO CELULAR_APOPTOSE E METABOLISMO CELULAR
<i>JAZF1, UHRF1BP1, BCL6, MECP2, ETS1, IKZF1</i>	REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL
<i>PXX, ICA1, XKR6, SCUBE1</i>	DESCONHECIDA

Fonte: TSOKOS et al., 2011.

GATEVA et al. (2009) através de estudo em larga escala identificaram 5 novos loci de susceptibilidade ao LES: TNIP1 (rs7708392), PRDM1 (rs6568431), JAZF1(rs849142), UHRF1BP1 (rs11755393) e IL10 (rs3024505) e confirmaram 16 outros loci de risco (HLA-DRB1 (HLA*DR3 e DRB1*0301), IRF5, TNFAIP3, BLK, STAT4, ITGAM, PTPN22, PHRF1, TNFSF4, BANK1, ATG5, PTTG1, PXX, FCGR2A, UBE2L3 e IRAK1-MECP2)

para a doença. Esses genes têm sido descritos na susceptibilidade a diferentes doenças autoimunes, sugerindo que fazem parte de vias que apresentam um importante papel na regulação da autoimunidade. Entre as associações encontradas estão o envolvimento do gene TNIP1 na susceptibilidade à psoríase (NAIR et al., 2009) e diabetes tipo 1 (FUNG et al., 2009) e do gene JAZF1 com o risco à diabetes tipo 2 (ZEGGINI et al., 2008).

Entre os fatores genéticos conhecidamente envolvidos na susceptibilidade ao LES encontram-se as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (HLA DR2 e HLA DR3), localizados na região cromossômica 6p21, se mostrando associados principalmente em pacientes descendentes de Europeus (CASTRO et al., 2008).

Componentes da via clássica do complemento, como o C1q, C1r, C1s, C4 ou C2, representam o fator de risco mais fortemente associado ao LES, por participar de mecanismo extremamente importante para a sua patogênese, como a "limpeza" de células apoptóticas (GHEBREHIWET & PEERSCHKE, 2004). Homozigotos deficientes de C1q foram associados com glomerulonefrite e manifestações de pele em pacientes com LES, resultante de uma deficiência funcional da proteína receptora (WALPORT et al., 1998). A presença de variantes alélicas em receptores Fc da imunoglobulina G, também tem sido descritos na redução da afinidade de ligação à subclasse de IgG, e consequente ineficiência da retirada de imunocomplexos (CASTRO et al., 2008).

O gene IKZF1 (fator de transcrição linfóide, família Ikaros dedo de zinco-1) (17p14.3), foi recentemente associado ao LES e apresenta importante papel na diferenciação e proliferação de linfócitos Th1, assim como na auto-tolerância através de regulação da sinalização de receptores de células B. Uma outra função é atuar como fator de transcrição essencial para as células dendríticas e na produção de IFN- γ . Estudo em larga escala mostrou associação do SNP rs4917014 em pacientes da população Chinesa (JIAN-WEN HAN et al., 2009), enquanto GRAHAM et al (2011) encontraram dois SNPs (rs2366293 e rs921916) no gene IKZF1 associados ao LES, em pacientes Europeus (GRAHAM et al., 2011)

O gene IFN, por sua vez, compreende uma família multigénica com 13 genes subtipos IFN- α e genes individuais que codificam IFN- ϵ , - κ , - τ , - δ e - ζ (LEVY et al 2003.). Os pacientes com LES apresentam um aumento nos níveis IFN- α no soro, correlacionando com a atividade e gravidade da doença (BENGTSSON et al., 2000). Uma das possíveis razões da produção contínua de IFN- α no LES é provavelmente a ativação das células dendríticas plasmocitóide (PDC) (BAVE et al 2000; LÖVGREN et al 2004). Fatores como a TYK2

(tirosina-quinase 2) (19p13.2), assim como fator 5 de regulação de IFN (IRF5) participam da ativação do receptor IFN α (IFNAR) e na regulação da expressão do IFN tipo I, respectivamente (DAVID et al., 2002). SIGURDSSON et al. (2005) encontraram associações nesses dois genes (*TYK2* (rs2304256) e *IRF5* (rs2004640) com LES na população Sueca e Finlandesa.

O gene *MBL2*, participa da primeira linha de defesa contra microorganismos, através de sua capacidade de reconhecer elementos de manose na superfície de bactérias ou fungos e iniciar a ativação do sistema complemento, também tem sido associada à patogênese do lúpus. Os alelos mutantes, que codificam formas protéicas instáveis, foram associados a um efeito modesto na susceptibilidade ao LES (SANDRIN-GARCIA et al., 2011).

A Proteína C-reativa (CRP), localizada na posição cromossômica 1q23.2, também apresenta um papel importante na modulação da imunidade inata. No entanto, ela age facilitando a retirada de detritos celulares, através da ativação do complemento e de sua ligação a receptores Fc (EDBERGET al., 2008). RUSSELL et al. (2003) mostrou a associação de polimorfismos presentes no locus *CRP2* e *CRP4* com o nível de proteína codificada pelo gene em pacientes com LES. Além da ligação do polimorfismo *CRP4* e a produção de autoanticorpos antinucleares, sugerindo o importante papel da eliminação de material potencialmente imunogênico na patogênese do lúpus. Pacientes com crise aguda da doença apresentaram uma resposta ineficiente para quantidade de proteína C reativa produzida e consequentemente maior susceptibilidade a doença.

Assim como o estudo de genes candidatos, estudos de ligação baseados em análise familiar e análises de associação genômica em larga escala (*GenomeWide*) vêm sendo utilizados na tentativa de determinar a predisposição genética no LES.

Recentemente, SANDRIN-GARCIA et al. (2009) avaliaram o perfil de expressão gênica de 4500 genes comparando pacientes com LES nas fases ativa e inativa da doença. Um total de 156 genes mostrou-se diferencialmente expressos quando comparados pacientes aos controles. Oito genes foram considerados candidatos a estarem envolvidos na patogênese da doença, entre estes o gene *STK17A* (Serina/threonina quinase 17A) localizado na região cromossômica 7p13, que apresentou expressão gênica reprimida em pacientes com LES na fase ativa da doença.

1.3.1 O gene STK17A

1.3.1.1 *Regulador de Apoptose*

O gene STK17A (Serine/threonine protein kinase 17A) é um regulador de apoptose ou morte celular programada, processo crítico durante o desenvolvimento. A desregulação da apoptose é responsável por uma vasta gama de doenças auto-imunes e neurodegenerativas, tendo em vista que apresenta papel crucial na manutenção da tolerância central e periférica, quanto no controle das populações linfocitárias auto-reativas geradas no curso de uma resposta imune (STUART et al., 2002). A apoptose tem sido sugerida por estar envolvida na patogênese do LES, no qual a deficiência da limpeza dos corpos apoptóticos pode levar a autoimunidade através da apresentação do material apoptótico às células apresentadoras de antígeno induzindo a resposta imune (ZANDMAN-GODDARD et al., 2002), sendo fonte para o desenvolvimento de anticorpos contra diversos constituintes celulares (MOK et al., 2011).

1.3.1.2 *Reparo das DSBs*

O reparo de DNA é um processo essencial para manter a estabilidade genômica, sendo que a falha nesse processo pode gerar mutações, translocações cromossômicas e morte celular. Muitos agentes endógenos (atividades metabólicas como replicação no DNA e recombinação V(D)J), quanto ambientais (radiação ionizantes e espécies reativas de oxigênio) podem causar quebras no DNA, resultando em cerca de 10.000 lesões moleculares individuais por dia. Essas quebras podem ser de fita simples (SSB do inglês, “Single-Stranded Break”) ou dupla (DSBs do inglês, “Double Strand Breaks”), sendo esta última a mais perigosa. Uma das respostas celulares as DSBs é a indução do aumento dos níveis de proteínas de reparo do DNA, sendo recrutados para o local da lesão do DNA (OHNISHI et al., 2009).

Existem dois mecanismos de reparo para as DSBs: recombinação homóloga (HR) envolvendo síntese de cromátides irmãs e a recombinação das extremidades não homólogas (NHEJ), que reúne as extremidades de uma quebra da fita de DNA na falta de uma sequência homóloga. A via NHEJ predomina principalmente na etapa G0 e G1 do ciclo celular, enquanto a HR têm uma importância particular durante as fases S e G2 (JACKSON et al., 2002).

Na via NHEJ, as duas subunidades KU70 e KU80 que formam a proteína heterodímera Ku, reconhecem a DSB e se ligam ao DNA em forma de uma estrutura de “anel aberto”, onde um dos lados do anel forma um “berço” que protege uma das extremidades da dupla hélice de DNA, enquanto, o outro lado é mais aberto, presumivelmente para permitir que outros fatores NHEJ possam acessar a DSB, como as proteínas quinases (DNA-PKs), no qual sua ativação parece ser desencadeada por uma interação de fita simples derivada de uma DSB, formando a holoenzima. Uma vez ligado à DSB, as DNA PKs que mostram atividade serina / threonina quinase, através do seu domínio catalítico promove a transdução de sinal induzido pelas DSBs, levando ao reparo da quebra de dupla fita de DNA (DSB). Após esse processo há o recrutamento de XRCC4 e LIG4 para o reparo da quebra (Figura 3) (KUSCHEL et al., 2002; JACKSON et al., 2002; WARMERDAM et al., 2010).

Alguns estudos mostram associação de polimorfismos presentes em genes de reparo com a susceptibilidade ao LES e suas manifestações clínicas. BASSI et al (2008) mostraram a diminuição da eficiência de mecanismos de reparo do DNA em pacientes com LES em comparação com controles. Os autores ainda observaram uma associação entre polimorfismos no gene XRCC1 (Arg399Gln) e a presença de anticorpos anti-dsDNA; polimorfismos no gene XRCC3 (Thr241Met) com anticorpo antifosfolípideo (APS) e dois sítios polimórficos associados à manifestações neuropsiquiátricas. LIN et al (2009) relataram uma associação entre o polimorfismo funcional (rs25487) no gene XRCC1Arg399Gln com a susceptibilidade ao desenvolvimento de LES. Os autores também observaram uma associação entre pacientes com LES com genótipo heterozigoto (XRCC1 Arg / Gln) e fotossensibilidade, eritema malar, doenças hematológicas, artrite e anticorpos antinucleares.

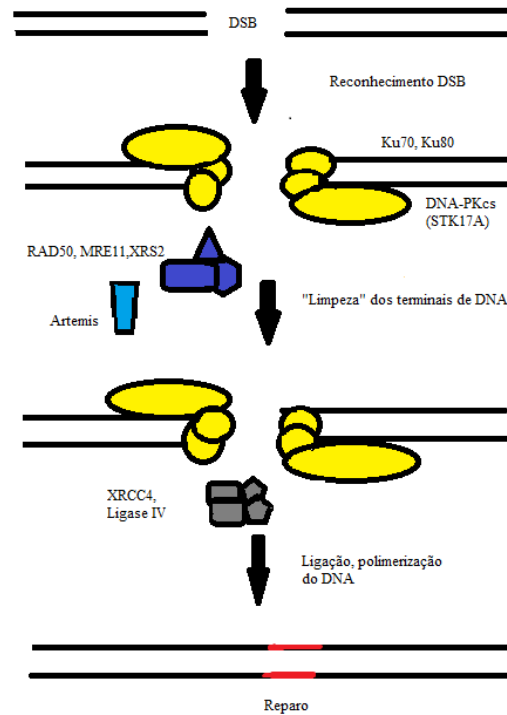


Figura 3 Recombinação de DNA não homóloga (NHEJ).
Fonte: (JACKSON et al., 2002)

1.4 POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPS)

O Projeto Genoma Humano proporcionou a descoberta em larga escala de milhões de SNPs, contribuindo assim para o desenvolvimento de várias áreas da pesquisa genética como: a populacional, forense, câncer e doenças, assim como no desenvolvimento de fármacos (COLLINS et al., 1998; WANG et al., 1998). Os Polimorfismos de base única (SNP) são variações em um único nucleotídeo gerando sequências alteradas (alelos), onde o alelo menos frequente tem uma abundância de cerca de 1% ou mais (COLLINS et al., 1998).

Em relação à natureza dessas mutações podem ser sinônimas ou missense, dependendo da alteração na proteína codificante. Na primeira não há influência na mudança de aminoácidos, ou seja, os alelos produzem a mesma sequência polipeptídica, também conhecida como mutação silenciosa (VIGNA A. et al., 2002). Embora, SNPs sinônimos não modifiquem a sequência protéica, podem agir alterando a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro tendo consequência na quantidade de proteína produzida. As mutações missenses, por outro lado, provocam a mudança no quadro de leitura codificando aminoácidos de naturezas diferentes. Mutações missenses são responsáveis por quase metade de todas as mutações no DNA, que são conhecidas por causar doenças genéticas (BROOKES, 1999; PRATT et al., 1999). Essas mutações podem estar presentes tanto em regiões codificantes

(éxons) como em não codificantes (íntrons), sendo que a presença desses marcadores em regiões codificantes e regiões promotoras tem maior probabilidade de influenciar na função do gene (COLLINS et al, 1997; CHAKRAVARTI et al., 1998; SYVÄNEN et al.,1999). Os SNPs podem atuar em vários mecanismos: promovendo o splicing alternativo, alterando o padrão de expressão de genes (no caso de SNPs presente na região promotora), geração ou supressão de códons de terminação ou poliadenilação de moléculas de RNA mensageiro, além de alteração nos códons de iniciação da tradução (ARAÚJO et al., 2009).

Segundo MANOLIO et al. (2008), o padrão de associação entre SNPs no genoma sugere um atalho potencial, com base em haplótipos e desequilíbrio de ligação (LD). Num contexto evolutivo, os haplótipos teriam sido gerados através do agrupamento de vários loci polimórficos (SNPs), sendo então replicados nas seguintes gerações, através de mecanismos de recombinações meióticas, que promove o embaralhamento dos alelos em diferentes loci ao longo do DNA, levando a uma conseqüente diminuição do nível de LD entre dois marcadores (BROOKES et al., 1999). Esse evento tem potencial para geração de novos marcadores e o aumento de "hotspot" através da distribuição não aleatória. Alelos de SNPs próximos tendem a ser associados uns aos outros, ou herdados juntos com maior frequência do que o esperado ao acaso (MANOLIO et al., 2008).

Todo esse mecanismo tem grande importância no estudo da composição genética das populações. Tendo em vista, que processos biológicos como história de uma população demográfica específica tais como: pontos de estrangulamento, mestiçagem, consanguinidade, migração, imigração, conversão gênica, deriva aleatória alteram o padrão de LD. A base genética de cada população associado com outros fatores reflete na susceptibilidade a determinadas doenças e a resposta à determinados medicamentos (BROOKES et al., 1999).

1.4.1 PCR em tempo real na detecção de SNPs

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de identificar conjuntos de SNPs que servirão como marcadores para predisposição de doenças multifatoriais através de estudos de associação ou por mapeamento de pontos de desequilíbrio de ligação em todo genoma (TÄPP et al., 2000; VALLADA et al., 2000).

Através da técnica de PCR (PCR, do inglês, Polymerase Chain Reaction) é possível obter a sensibilidade e especificidade suficientes para a detecção de base única na complexidade do genoma humano. A partir da simulação “in vitro” do que ocorre “in vivo” no processo de replicação natural do DNA, faz-se possível a amplificação de cópias de DNA, sendo catalisadas pela enzima termoestável, DNA Polimerase (Taq Polimerase) (MULLIS, 1986). O método de PCR se baseia em repetidos ciclos de desnaturação, hibridização e amplificação com diferentes ciclagens de temperatura, onde na primeira etapa, há a separação da dupla fita de DNA (dsDNA) a uma temperatura (95°C), em seguida anelamento dos iniciadores a uma temperatura (50-60°C) e finalmente um novo aumento da temperatura (72°C) para atingir a temperatura ideal da enzima (KUBISTA et al., 2006). Cada uma das fitas de DNA estendidas serve como molde para a síntese de uma nova fita, isso garante o aumento exponencial do número de novas fitas. Da mesma forma, uma quantidade de produto de PCR relativamente pequena (DNA, cDNA ou RNA) podem ser quantificados através de uma plataforma de instrumentação, que contém um termociclador com sistema ótico para excitação da fluorescência dos fluoróforos e outro para a recepção da emissão, torna-se possível o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos, onde as informações adquiridas são transmitidas para softwares que analisam e calculam os dados finais da reação (ESPY, 2006, NOVAIS et al., 2004).

Entre os fluoróforos mais usados estão o SYBR® Green e as sondas TaqMan®. O SYBR® Green, apesar do seu baixo custo e facilidade no uso, se liga em todo o DNA gerado durante a reação, incluindo os dímeros de iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração de fragmentos alvos (NOVAIS et al., 2004).

As sondas TaqMan® são sondas de sequência específica duplamente marcadas com fluoróforo. No qual, um dos fluoróforos é denominado "quencher" e o outro é o "repórter". Quando o "quencher" e o "repórter" estão próximos, a energia do fluoróforo é transferida a partir de um "doador" (repórter) para um "receptor" (quencher) (WHITCOMBE et al., 1998). Durante o processo de amplificação, o oligonucleótido é separado pela ação da Taq DNA polimerase, através de sua atividade exonuclease 5'-3' separando assim o "repórter" do "quencher", permitindo que a energia do repórter e o sinal fluorescente seja então liberado (Figura 4).

Dessa forma a amplificação específica de DNA é garantida pelo aumento do sinal do "repórter" gerado como resultado da hidrólise dos oligonucleótidos. Entre os fluoróforos

"quenchers" mais comuns estão o TAMRA, DABCYL e BHQ, enquanto os "repórteres" são FAM, VIC, NED, etc (VALASEK et al., 2005).

A análise dos resultados gerados pela plataforma de PCR em tempo real permite a avaliação da curva de amplificação, cujo processo é dividida em 3 fases: (1) fase “screening” que ocorre durante os primeiros ciclos, quando os iniciadores se ligam ao DNA alvo; (2) fase de amplificação (fase log) onde a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo; (3) fase platô que ocorre durante os ciclos finais, quando todas as enzimas e iniciadores foram consumidos e a reação se torna saturada, deixando de ser exponencial, não havendo mais aumento no número de produtos (WILHELM et al., 2003). A quantificação precisa dos ácidos nucleicos pode ser feita através do “Cycle Thresbold” (Ct) gerados durante a fase exponencial da amplificação, em que a quantificação é possível baseada na fluorescência, que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR (DUSSAULT et al., 2006; NOVAIS, 2004).

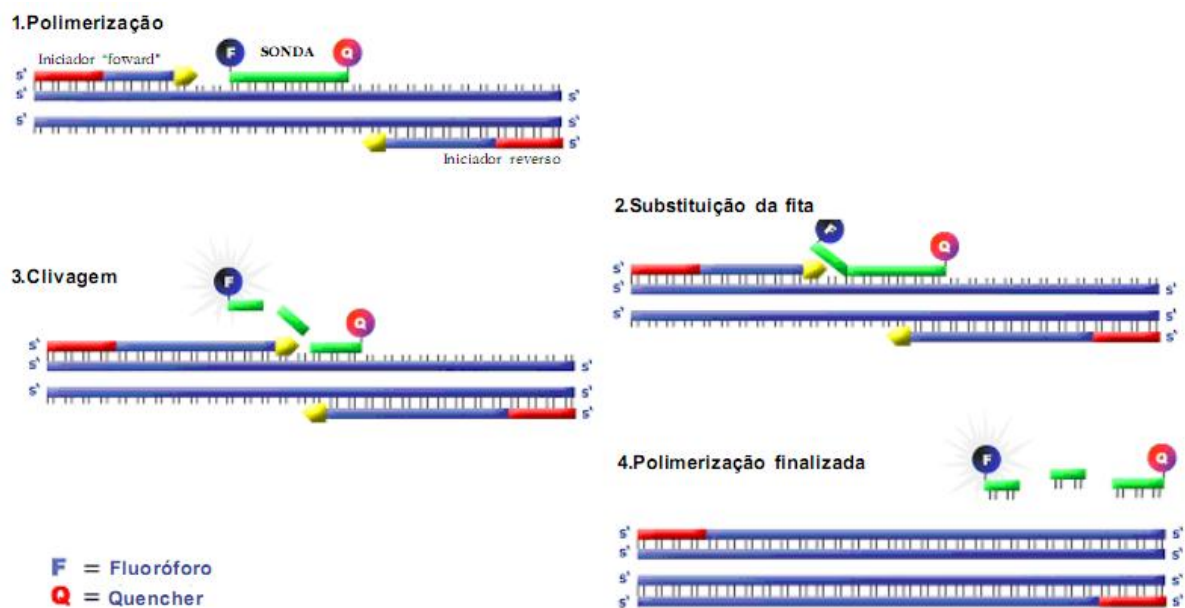


Figura 4: Etapas da PCR real time.
Fonte: (NOVAIS et al., 2004)

1.5 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

O tipo de tratamento escolhido para cada paciente depende da gravidade e da função do órgão acometido pela doença. Entre os quimioterápicos utilizados estão anti-inflamatórios não esteróides, agentes antimaláricos, glicocorticóides e medicamentos imunossupressores, incluindo ciclofosfamida, azatioprina, metotrexato e micofenolato mofetil (TSOKOS et al., 2011). Alguns desses tratamentos terapêuticos apresentam uma toxicidade considerável às células humanas, como a ciclofosfamida intravenosa, que apesar de ser eficaz no tratamento de lúpus nefrítico, apresenta efeitos colaterais graves como a supressão da medula óssea e na supressão gonadal (ILLEI et al., 2001).

Como alternativa para o uso de quimioterápicos, outras estratégias têm sido desenvolvidas, com o intuito de restabelecer a tolerância em pacientes com LES, utilizando como alvo diferentes células e componentes do sistema imune. Entre essas está o bloqueio da BLYS, citocina envolvida na sobrevivência das células B, que resultou em uma modesta resposta clínica, mas significativa, no primeiro ano de tratamento em pacientes com a doença (NAVARRA et al., 2011). Este anticorpo (belimumab) é aprovado pela “Food and Drug Administration” para utilização no tratamento do LES (ZHANG et al., 2001; GROSS et al., 2000).

Outro método é o bloqueio de receptores de interleucina-6, interleucina-17 e interleucina-23 com anticorpos monoclonais, essas interleucinas apresentam mecanismos importantes na patogênese da nefrite lúpica (TSAI et al., 2000; CRISPÍN et al., 2008; ZHANG et al., 2001). Da mesma forma, inibidores de proteínas como: Syk e CaMK4, também podem ser alvos de novas abordagens terapêuticas, tendo em vista que apresentam suas expressões desreguladas em pacientes com LES. Inibidores dessas proteínas suprimiram a doença em camudongos propensos ao LES (ICHINOSE et al., 2011; DENG et al., 2010).

Estudos em modelos animais mostraram associação de baixos níveis de vitamina D (<10 ng/ml) com a presença de doenças renais (OR= 13.3, $p<0.01$) e fotossensibilidade (OR= 12.9, $p<0.01$) em pacientes com LES (KAMEN et al., 2006). Tratamento com essa vitamina mostrou se associada com o alívio das manifestações da doença, podendo estar ligada a inibição da maturação das células dendríticas, da produção de citocinas e da ativação das células T, tendo em vista o efeito imunomodulatório do receptor de vitamina D, porém são necessários mais estudos para comprovar a eficácia desta terapia em humanos (KAMEN et al., 2006; THUDI et al., 2008; RUIZ-IRASTORZ 2008; MARQUES et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a associação de polimorfismos no gene STK17A com a predisposição ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em pacientes brasileiros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar SNPs nas sequências do gene STK17A que serão utilizados como sondas de hibridização fluorescentes em PCR em tempo real.
- Genotipar os polimorfismos desse gene em pacientes brasileiros com Lúpus Eritematoso Sistêmico utilizando a tecnologia de PCR em tempo real para correlacionar com a susceptibilidade à doença.
- Realizar análises estatísticas visando associar os genótipos/ haplótipos à ocorrência dos sinais clínicos do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

REFERÊNCIAS

- ABU-SHAKRA, M. et al. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center I. Causes of death. *J. Rheumatol.*, 1995, vol.22, p. 1259-64.
- ALARCÓN, G.S. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. Feature predictive of disease activity early in its course. *Arthritis Rheum.* 1998, vol.41 (nº11), p.73-80.
- ALVES, L.J.; HYDALGO, L; ROLIM L F. Avaliação Clínica e Laboratorial da Cardiopatia no Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Arq. Bras. Cardiol.*, 1997, vol. 68 (nº2), p.79-83.
- ALVES, M.A.V.F.R. Revisão/Atualização em Nefrologia Clínica: Nefrite lúpica. *J. Bras. Nefrol.*, 1997, vol. 19(nº2), p. 193-196.
- ARAÚJO, K.L. et al., O Papel de polimorfismos de base única (SNPs) PVuII e XbaI e das Pequenas Repetições em Tadem (STRs) (TA)_n e (GT)_n do receptor de Estrogênio Alfa (ESRI) na susceptibilidade ao Câncer de mama. *Revista brasileira de Cancerologia*, 2002, vol.55 (nº2), pag.185-192.
- ARAUJO, J.M.F. et al. Associação entre Lúpus Eritematoso e tabagismo. *An. Bras. Dermatol.*, 2008, vol. 83(nº4), p.303-8.
- BARRETT, C.; NEYLON, N.; SNAITH, M.L. Oestrogen-induced systemic lupus erythematosus. *Br J. Rheumatol.*, 1986, vol. 25:300-1.
- BASSI, C. et al, Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008, vol. 17(nº11): 988-95.
- BATRINOS, M.L; PANITSA-FAFLIA, C.; TSIGANOU, E. Incidence and characteristics of microprolactinomas (3-5 mm) in 4199 women assayed for prolactin. *Horm. Metab. Res.*, 1992 vol. 8, p.384-91.
- BÄVE, U.; ALM, G.V.; RÖNNBLÖM, L.The combination of apoptotic U937 cells and lupus IgG is a potent IFN- α inducer. *J Immunol.*, 2000, vol. 165, p3519–3526.
- BENEDEK, T.G. William Osler and development of the concept of systemic lupus erythematosus. *Sem Arthritis Rheum.*, 1997, vol. 27, p.48–56.
- BENGTSSON, A.A. et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus*, 2000, vol. 9, p.664–671.
- BERBERT, A.L.C.V; MANTESE, S. Lúpus eritematoso cutâneo- Aspectos clínicos e laboratoriais. *An. Bras. Dermatol.*, 2005, vol.80(nº2), p.119-31.

BEZERRA, M.C.; JÚNIOR, F.S.S.; NETO, E.F.B. Contribuição da Doença e sua Terapêutica no Índice de Danon. SLICC/ACR na Fase Precoce do Lúpus Eritematoso Sistêmico. Rev. Bras. Reumatol., 2004, vol. 44, n. 2, p. 123-8.

BHATTACHARYA, A.; SONI, S.; JAIN, R. Systemic Lupus Erythematosus: A Review. Pharmacology, 2011, vol.3, p.812-825.

BLOTZER, J.W. Systemic lupus erythematosus I: historical aspects. Maryland State Med J 1983, vol. 32, p. 439.

BROOKES, A.J. The essence of SNPs. Gene, 1999, vol.234, p.177–186.

BUYON, J.P. Oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. Ann. Med. Interne, 1996, vol.147, p. 259-64.

CASCIOLA-ROSEN, L.A.; ANHALT, G.; ROSEN, A. Autoantigens targeted in systemic Lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structure on apoptotic keratinocytes. J. Exped. Med., 1994, vol.179, p. 1317-1330.

CASOLI, P.; TUMIATI, B.L.A.; SALA, G. Fatal exarcebation of SLE after R: Elevated bioactive Prolactin levels in Systemic Lupus Erythematosus – Association with disease activity. J Rheumatol., 2001, vol.28, p. 2216-21.

CASTRO, J.B.E.; ORDIS-ROS, J.; VILARDELL-TARRES, M. The complex imunogenetic basis of systemic lupus erytematosus. Autoimmun Rev, 2008, vol.7 (n°5), p.345-51.

CAZENAVE, P.L.A; SCHEDEL, H.E. Manual of the diseases of the skin. London: Henry Renshaw, 1852.

CAZNOCH, C.J; ESMANHOTTO, L.; SILVA, M.B. Padrão de Comprometimento Articular em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e sua Associação com Presença de Fator Reumatóide e Hiperelasticidade. Rev. Bras. Reumatol., 2006, vol. 469(n°4), p. 261-265.

COHEN, O.; KIMCHI, A. DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. Cell Death and Differentiation. Nature, 2001, vol. 8, p. 6 ± 15.

COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.E; CHAKRAVARTI, A. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. Genome Res, 1998, vol. 8: 1229-1231.

COSTENBADER, L.H.; KARLSON, E.W. Cigarette smoking and systemic lupus erythematosus: a smoking gun? Autoimmunity, 2005, vol.38, p.541-7.

CRISPIN, J.C.; MARTINEZ, A.; ALCOCER-VARELA, J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. J. Autoimmun., 2003, vol.21 (n°3), p.273-6.

CRISPÍN, J.C. et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. J Immunol. , 2008, vol.181, p.8761-6.

CRUVINELW, M.J.R.D; ARAUJO, P.A.J. CélulasT Regulatórias Naturais (TREGS) em Doenças Reumáticas; Rev. Bras. Reumatol., 2008, vol. 48(n.6), p. 342-355.

DAVID M. Signal transduction by type I interferons. Biotechniques Suppl., 2002, vol. 33, p.58–65.

DENG, G.M.; LIU, L.et al. Suppression of skin and kidney disease by inhibition of spleen tyrosine kinase in lupus-prone mice. Arthritis Rheum, 2010, vol. 62, p.2086-92.

DROR, Y. et al. Systemic lupus erythematosus associated with acute Epstein-Barr virus infection. Am J Kidney Dis. 1998, Vol 32(5) pag. 825-828.

FERREIRA, M.et al, Lúpus eritematoso sistémico, Acta Med Port, 2008, vol.21(n°2), p.199-204.

FREEMER, M.M.; KING, J.R.T.E; CRISWELL, L.A. Association of smoking with dsDNA autoantibody production in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis, 2006, vol. 65, p.581–584.

GATEVA, V.; SANDLING, J.K.; HOM, G. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF,UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus Erythematosus. Nat Genet, 2009, vol. 41(n°11), p. 1228–1233.

GEORGE, J.; LEVY, Y.; SHOENFELD, Y. Smoking and immunity: an additional player in the mosaic of autoimmunity. Scand J. Immunol. 1997, vol.45, p.1-6.

GHAUSSY ,O.N.; SIBBITT, W.L.; QUALLS, C,R. Cigarette smoking, alcohol consumption, and the risk of systemic lupus erythematosus: a case control study. J Rheumatol., 2001, vol. 28, p.2449-52.

GRAHAM, D.S.C. et al. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with Systemic Lupus Erythematosus. PLoS Genetics, 2011, vol. 7 (n° 10).

GRIPENBERG, M.; Helve, T: Outcome of systemic lupus erythematosus. A study of 66 patients over 7 years with special reference to the predictive value of anti DNA determination. Scand J Rheumatol. 20: 104-9, 1991.

GROSS, J.A. et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. Nature, 2000, vol.404, p.995.

HARVEY, A.M: Systemic Lupus erythematosus: review of literature and clinical analysis of 138 cases. Medicine 33: 291-437, 1954.

HOCHBERG, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. Arthritis Rheum, 1975, 1997, vol. 40.

HOM, G.; GRAHAM, R.R.; MODREK, B., et al. Association of systemic lupus erythematosus with *C8orf13-BLK* and *ITGAM-ITGAX*. N Engl. J. Med 2008; 358: 900-9.

HUGHES, T. et al. Analysis of autosomal genes reveals gene–sex interactions and higher total genetic risk in men with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2011, doi:10.1136/annrheumdis-2011-200385.

ICHINOSE, K. et al. Suppression of auto immunity and organ pathology in lupus-prone mice upon inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV. *Arthritis Rheum*, 2011, vol.63, p.523-9.

ILLEI, G.G. et al. Combination therapy with pulse cyclophosphamide plus pulse methyl prednisolone improves long-term renal outcome without adding toxicity in patients with lupus nephritis. *Ann Intern Med*, 2001, vol.135, p. 248-57.

JACKSON, S.P. Sensing and repairing DNA double strand breaks. *Carcinogenesis*, 2002, vol. 23 (n°5), p.687-696.

JIAN-WEN, H. et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics*, 2009, vol. 41, pag.1234 - 1237.

KAMEN, D.L.; COOPER, G.S.; BOUALI, H.; SHAFTMAN, S.R, Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus . *Autoimmun. Rev.*2006, vol.5(n°2), p.114-7.

KATZ, B.Z. et al. Epstein-Barr virus burde in adolescents with systemic lupus erythematosus. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2001, Vol 20 (2) p.148-153.

KOMINSKY, S.; AMORIM, R.; MONTEIRO, E.O papel do Vírus Epstein Barr na etiopatogenia do Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Revista Paraense de Medicina*, 2006, vol.20 (n°1).

LAHITA, R.G. The clinical presentation of systemic lupus erythematosus In: Lahita RG. *Systemic lupus erythematosus*. 4th ed. New York: Academic Press, 2004. p. 435-48.

LAWRENCE, E.C. Systemic lupus erythematosus and the lung. In: Lahita RG. *Systemic lupus erythematosus*. 4th ed. New York: Academic Press, 2004, p. 961-74.

LEE, J.Y. et al. Neurotoxic autoantibodies mediate congenital cortical impairment of offspring in maternal lupus. *Nat Med*, 2009, vol.15, p.91-6.

LEVY, D.E.; MARIE, I.; PRAKASH, A. Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003, vol. 15, p.52–58.

LI, X. et al. Fc gamma receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun*, 2009, vol.10, pag.380-9.

LIN, Y, J. et al. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and associations with systemic lupus erythematosus risk in the Taiwanese Han Chinese population. *Lupus*, 2009, vol.18, p.1246–1251.

LÖVGREN, T. et al. Induction of interferon- α production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum*, 2004, vol. 50, p. 1861–1872.

MANOLIO, T. A.; BROOKS, L. D.; COLLINS, F.S. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, vol. 118(nº 5).

MARQUES, C.D.L.; DANTAS, A.T; FRAGOSO, T.S. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. *Rev. Bras. Reumatol.*, 2010; vol. 50(nº1), p.67-80.

MEINÃO, M.I.; SATO EI. Lúpus eritematoso sistêmico de início tardio. *Einstein*. 2008, vol. 6.

MERREL, M.; SHULMAN, E. Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by lupus erythematosus. *J. Chronic Dis* 1: 12-32, 1955.

MOK, C.C, LAU, C.S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus, *J ClinPathol.*, 2003, vol.56, p.481–490.

MOREIRA, M.D.; MELLO, F.J. Psicoimunologia hoje. In: Mello Filho J: *Psicossomática hoje*. Porto Alegre, Artmed, 1992, p 119-51.

MOTA, L.M.H.; HADDAD, G.P.; LIMA, R.A.C. Lúpus Induzido por Drogas – Da Imunologia Básica à Aplicada. *Rev. Bras. Reumatol.*, 2007, vol.47 (nº6), p. 431-437,

MULLIS, K.; FALOONA, F.;SHARF, S. Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986, vol. 51.

NAVARRA, S.V. et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2011, vol. 377, pag. 721-31.

NOVAIS, C.M; ALVES-PIRES, M. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2004, Edição (nº33).

OSLER, W. On the visceral complications of the erythema excudativum multiforme. *Am J Med Sci*, 1895, vol.110, pag.629–646.

OSLER, W. On the visceral manifestations of the erythema group of skin diseases. *Am J Med Sci*, 1904, vol.127, pag. 1–23.

OSLER, W. The visceral manifestations of the erythema group. *Br J Dermatol*, 1900, vol.12, pag. 227–245.

PACILIO, M. et al. Elevated bioactive Prolactin levels in Systemic Lupus Erythematosus – Association with disease activity. *J Rheumatol*, 2001, vol. 28, pag. 2216-21.

PEEVA, E.; VENKATESH, J.; MICHAEL, D.; DIAMOND, B. Prolactin as a modulator of B cell function: implications for SLE. *Biomed. Pharmacother*, 2004, vol. 58, pag. 310-9.

PETRI, M. Cardiovascular systemic lupus erythematosus. In: Lahita RG. *Systemic lupus erythematosus*. 4th ed. New York: Academic Press, 2004, p. 913-42.

RUS, V.; HOCHBERG, M.C. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois lupus erythematosus*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p 65-83, 2002.

RUSSELL, A.L.; GRAHAM, D.C.; SHEPHERD, C. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum. Mol. Genet*, 2004, vol. 13 (nº1), pag. 137-147.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 2000, vol.101 (nº5), pag. 455-8,

SAKAGUCHI, S. et al. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev. Immunol.*, 2004, vol.22, pag. 531-62.

SAMPAIO, M. C. A; SILVA, C. A.A; PEREIRA, R.M.R. Lúpus eritematoso discóide na infância. *Rev. Paul Pediatría*, 2007, vol.25(nº2), pag. 167-71.

SATO, E.I. et al. Consenso Brasileiro para o Tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Rev Bras Reumatol*, 2002, vol. 42, pag. 362-9.

SCOFIELD, R. H.; OATES, J. C. The place of William Osler in the description of systemic lupus erythematosus. *Am J. Med. Sci*, 2009, vol. 338(nº5), pag. 409–412. doi:10.1097/MAJ.0b013e3181acbd71.

SHEVACH, E.M. et al. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol*, 2000, vol.18, pag. 423-49.

SHRIVASTAV, M.; HARO, L. P.; NICKOLOFF, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 2008, vol. 18, pag.134-147.

SIGURDSSON, S.; NORDMARK, G.; GÖRING, H. H. H. Polymorphisms in the Tyrosine Kinase 2 and Interferon Regulatory Factor 5 Genes Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *Am J Hum Genet.*, 2005, vol. 76(nº3), pag. 528–537.

SOUTO, L.B.; DAOLIO, L.; MACEDO, C.G. Tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). *Temas de Reumatologia Clínica*, 2007, vol. 8 (nº 1).

SOUZA, A.W.S.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P. Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Rev Bras Reumatol*, 2010, vol.50 (nº6), pag. 665-94.

STUART, L.; HUGHES, J. Apoptosis and Autoimmunity. *Nefrol. Dial. Transplant*, 2002, vol. 17, pag. 697-700.

SULLIVAN, K.E. Genetics of systemic lupus erythematosus: clinical implications. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.*, 2000, vol. 26, pag. 229-256.

OHNISHI, T. et al., DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes, *Mutat. Res.: Fundam. Mol. Mech. Mutagen*, 2009; doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.06.010.

TISKIEVICZ, F. et al. Prolactina e Macroprolactina no Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). *Rev Bras Reumatol*, 2005, vol. 45 (nº 3), p. 191-4.

TSAI, C.Y. et al. Increased excretions of beta2-microglobulin, IL-6, and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine o patients with active lupus nephritis. *Nephron*, 2000, vol.85, pag. 207-14.

TSOKOS, G.C. Mechanisms of Disease Systemic Lupus Erythematosus. *Nengl. J. med*, 2011, vol. 365, pag. 22.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. *Adv.Physiol.Educ*.29, 2005, pag. 151–159; doi:10.1152/advan.00019.2005.

VALLADA, F.H.P., SAMAIA, H. Aspectos genéticos e fatores de risco *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 2000, vol.22 (Supl I I), pag.2-4.

VAN, B.M.C. et al. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.*,1997, vol.12, vol.57–66.

VIANNA, R.; SIMÕES, M.J.; INFORZATO, H.C.B. Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Revista Ceciliana*. 2010, vol.2(nº1), pag. 1-3; ISSN 2175-7224 - 2009/2010.

VERDOLINI, R. et al. Lúpus erythematosus induced by Epstein-Barr virus infeccion. *BR. J. Dermatol*. 2002, Vol. 146 (5) pag. 877-881.

VIGNAL, A. et. al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics *Genet. Sel. Evol.*, 20023, vol.4. 275_305 DOI: 10.1051/gse.

VILAR, M.J, SATO, E.I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*, 2002. vol. 11, pag. 528-32.

VYSE, T.J; KOTZ, BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erytematosus. *Annu Rev. Immunol*. 1998, vol.16, pag.261-292.

VOLTARELLI, J.C.; STRACIERIA, B.P.L.; OLIVEIRA, M.C.B. Transplante de células-tronco hematopoéticas em doenças reumáticas. Parte 2: experiência brasileira e perspectivas futuras. *Rev. Bras. Reumatol.*, 2005, vol.45(nº5).

VOLTARELLI, J.C. Transplantes de células tronco hematopoéticas para doenças auto-imunes no Brasil. *Rev. bras.hemtol. hemoter*, 2002, vol.24 (n°1), pag. 9-13.

WAKELAND, E.K. et al. Delineating the Genetic Basis Review of Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, 2001, vol. 15, pag. 397–408.

WALKER, S.E.; JACOBSON, J.D. Roles of prolactin and Gonadotropin-Releasing Hormone in rheumatic disease. *Rheum. Clin. Dis N Am* 26: 713-35, 2000.

WALLACE, D.J; LYON, I. Pierre Cazenave and the first detailed modern description of lupus erythematosus. *Sem Arthritis Rheum*, 1999, vol.28, pag. 305–313.

WALPORT, M.J.; DAVIES, K.A.; BOTTO, M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*, 1998, vol.199, pag. 265–85.

WANG, Z.; MOULT, J. SNPs, Protein Structure, and Disease. *Human Mutation*, 2001, vol. 17, pag.263.270.

WARMERDAM, D.O.; KANA, A.R . Dealing with DNA damage: Relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutation Research*, 2010, vol.704, pag. 2–11.

WHITCOMBE, D.; BROWNIE, J.; GILLARD, H. A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping. *Clinical Chemistry*, 1998, vol. 44 (n° 5).

ZANDMAN-GODDARD, G.; BLANK, M. Apoptosis and Autoimmunity. *IMAJ*, 2002, vol. 4, pag. 722-724.

ZHANG, J.; ROSCHKE, V.; BAKER, P. Stimulator in Systemic Lupus Erythematosus Cutting Edge. A Role for B Lymphocyte. *J. Immunol*, 2001, vol. 166, p.6-10.

ZHANG, Z.; KYTTARIS, V.C.; TSOKOS, G.C. The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J. Immunol.*, 2009, vol.183, p. 3160-9.

ZÚÑIGA, E.C.; TOBÓN, G.; MARTÍNEZ, S.X.Z. et al. Lupus discóide. *Rev. Colomb. Reumatol.*, 2008. vol. 15(n° 1) pag. 55-58.

APÊNDICE A - MANUSCRITO “STK17A (Serine/threonine protein kinase 17A) gene polymorphisms are associated with Systemic Lupus Erythematosus and cutaneous manifestations”

“STK17A (*Serine/threonine protein kinase 17A*) gene polymorphisms are associated with Systemic Lupus Erythematosus and cutaneous manifestations”

Andréia Maria da Silva Fonseca¹, João Alexandre Trés Pancotto², Eduardo Antônio Donadi², Ludovica Segat³, Sergio Crovella⁴, Paula Sandrin-Garcia^{1, 4}.

1. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
2. Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil.
3. Institute for Maternal and Child Health - IRCCS “Burlo Garofolo” – Trieste, Italy
4. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding Author:

Paula Sandrin-Garcia

Department of Genetics/ Federal University of Pernambuco

Av Moraes Rego, 1235

Recife/ Brazil

CEP 50760-901

Telephone 55 8121268586/ Fax 55 8121268484

e-mail: paula.sandrin@ufpe.br

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease with various clinical manifestations. The exact etiology of SLE is unknown, being probably of multifactorial nature and many different genes contribute to disease susceptibility. We investigated the possible association between five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the STK17A gene, encoding for serine/threonine-protein kinase 17A, which is involved in the repair of double-stranded breaks in DNA (DSBs), and susceptibility to SLE. A total of 143 SLE patients and 177 healthy controls from Southern Brazil were studied through Taqman SNP Genotyping Assays. Significant difference was observed comparing patients and controls after stratifying for gender between A/A genotype in the SNP rs10259269 (0.7% vs.7.6) conferred a protection for SLE development in females (OR=0.09, p-value= 0.01). When analyzed the distribution of the haplotypes, was found association between two haplotypes: TGGTT and TAGTC (OR=0.54, p-value=0.01 and OR=0.25, p-value=9.04e-08, respectively) in SLE patients conferred protection to disease development. Interestingly, after stratification for ethnicity (European-ancestry) and gender (female) the TAGTC haplotype again conferred protection to SLE (OR= 0.25, p-value= 2.30e-06 and OR= 0.41, p-value=0.01, respectively). A significant association was observed between GA genotype for the rs7802995 SNP with susceptibility to the development of cutaneous manifestation in SLE patients (OR= 3.44, p - value= 0.004.). Finally, after patients were stratified by ethnicity, a manifestation serological anti ds-DNA showed a significant association in the protection of African descendent (OR=0.11, p-value=0.009). Although still unknown the functional role of SNPs associated in the STK17A gene with susceptibility to SLE. We suggest participation of the STK17A gene in the process repair of double strand breaks in DNA, and that polymorphisms in this gene can lead susceptibility to SLE, in view of that patients with lupus shows deficiency in this mechanism. Thus, we conclude that STK17A can be considered as candidate gene in SLE, since polymorphisms were significantly associated with susceptibility to SLE and clinical manifestations development.

KEYWORDS: Systemic Lupus Erythematosus; Serine/threonine protein kinase 17A; *STK17A* gene; genetic polymorphisms; cutaneous manifestation; Anti ds-DNA.

INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a prototype of autoimmune disease, characterized by the presence of various clinical and immunological manifestations. About 50% of patients with SLE will develop the more severe symptoms of the disease, such as nephritis and cerebral vasculitis.¹ The etiopathology of SLE has not been fully elucidated yet, but several studies suggest the involvement of genetic, environmental, hormonal and immunological factors leading to disease onset.² SLE is a multifactorial disease and several genes may contribute to loss of immunological tolerance and increase of the susceptibility: genes encoding proteins with regulatory functions or adaptive such as PTPN22,³ CTLA-4,⁴ IRF5,⁵ PDCD-1,⁶ STAT4⁷ have been already described as associated with SLE.

In recent years, several studies using microarrays analysis and gene expression profiling allowed the uncovering of gene expression patterns in various diseases. These studies identify genes that are expressed at higher or lower levels in patients compared to controls, being possible candidates involved in the pathogenesis of diseases.⁸ Using cDNA microarray technology, Sandrin-Garcia et al (2009)⁹ evaluated the gene expression profile of 4500 genes comparing SLE patients in active and inactive phases of the disease. A total of 156 genes were differentially expressed in patients when compared to controls. Eight genes shared between active and inactive SLE patients were considered as possibly involved in the pathogenesis of the disease; one of these, the STK17A (Serine/Threonine kinase 17A) gene, was repressed in SLE patients during the active disease (Fold Change -154). STK17A gene (7p13), also known as DRAK1 (DAP protein kinase related apoptosis-inducing kinase 1 of 46,56 kDa) encodes a nuclear autophosphorylated protein, which can is involved in the processing and repair of double-stranded breaks in DNA (DSBs): STK17A catalytic domains play a central role in signal transduction induced DSBs, generated subsequently to DNA

damage caused by endogenous and/or environmental agents.^{10,11} An accumulation of breaks in DNA combined with nuclear proteins may trigger the production of immunogenic antigens, leading to auto-reactive antibodies production, consequently generating an autoimmune response in susceptible individuals.^{12,13}

Since that cellular mechanisms involved in DSBs such as DNA repair, cell cycle checkpoint and apoptosis represent the limit for generate mutations and proliferation of damaged cells. Changes in this gene may indicate that patients with lupus may have an inadequate response to repair of DSBs and considering the pathogenesis of SLE is not well established, we believe that this gene may be a possible candidate involved in disease susceptibility.

Thus, we analyzed five STK17A tag SNPs, localized at regulatory region of the STK17A gene, in SLE patients and controls from Southern Brazil looking for association with susceptibility to disease development.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

We analyzed genomic DNA samples from 143 patients with aged between 17 and 67 years (mean 39.8 ± 11.9) clinically diagnosed with SLE according to the American College of Rheumatology Classification Criteria (ACR, 1997). Samples were obtained from the Division of Clinical Immunology of the Hospital of Ribeirão Preto, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (University of São Paulo, Brazil). Clinical and laboratory data regarding SLE patients are shown in Table 1. Genomic DNAs from 177 healthy controls without previous family history of autoimmune disorders were also obtained. All the controls were blood donors and

filled a questionnaire not reporting the presence of others autoimmune disorders (namely, type 1 diabetes, autoimmune thyroiditis, celiac disease, etc.).

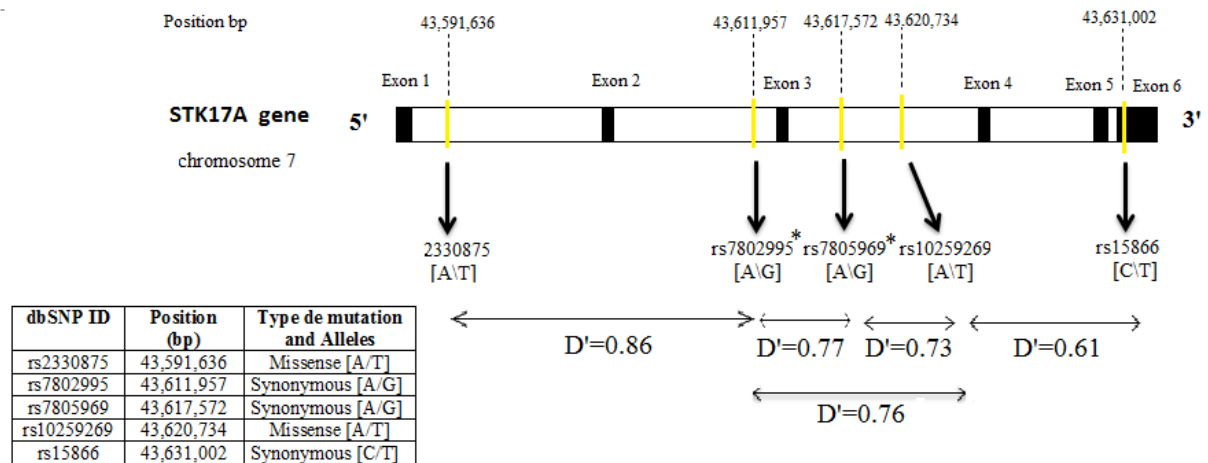
Patients and controls were stratified according to ethnicity as African or European - ancestry according to the color skin phenotype and ethnicity data of parents/grandparents reported by the participants. The issue concerning skin color-based classification criteria adopted in Brazil is well documented and has been already assessed in previous studies.^{14,15} Among 143 patients, 113 (79%) were of European-ancestry and 30 (21%) African-ancestry. In the control group, 131 (74%) were of European-ancestry and 46 (26%) African-ancestry. According to gender, 135 patients (94.4%) were female and 8 (5.6%) were male, and 79 (44.6%) were female and 98 (55.4%) were male in the control group.

Written informed consent was obtained from all individuals and the local Ethics Committee approved the protocol of this study (#2234/2007).

SNPs selection and STK17A genotyping

SNPBrowser™ Software version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and National Center of Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/SNP/> were used to select SNPs for the STK17A gene. Five Tag SNPs were selected with MAF (minor allele frequency) $\geq 10\%$ in STK17A coding and intronic regions, in the attempt to cover the entire gene, which is composed of six exons and five introns (Figure 1). Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using a salting out procedure.¹⁶ Patients and controls were genotyped for the selected SNPs in STK17A gene by using Taqman fluorogenic probes (SNP genotyping assay rs2330875, rs7802995, rs7805969, rs10259269 and rs15866 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

and ABI7500 Real Time PCR platform (Applied Biosystems) according to manufacturer's protocol. Allelic discrimination was performed using the SDS software (v. 2.3) (Applied Biosystems).



Data Analysis

Genotype Transposer (Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics*. 2001 Aug; 17(8):738-9) was used to calculate allelic and genotypic SNPs frequencies and verify the Hardy-Weinberg equilibrium for all SNPs in the populations studied. Fisher's exact test was used to test associations between SNPs allelic and genotype frequencies with clinical/laboratory manifestations, beyond of patients/control comparison for disease susceptibility. The odds ratio (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were evaluated using the R 2.10.0 (<http://www.r-project.org/>) software. SNPstat (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) was employed to determine haplotypes ($D' = 0.66 - 0.99$), evaluate linkage disequilibrium pattern (LD) and to normalization of the frequencies correlating gender and ethnicity. The p-value < 0.05 was considered statistically significant. To adjust the p-values for multiple testing, was applied a Bonferroni correction. Genotype associations with clinical and laboratory features

were analyzed using the EpiInfo version 3.5.1 software (<http://www.cdc.gov/epiinfo/about.htm>).

RESULTS

We analyzed five STK17A gene SNPs in 143 SLE patients and 177 controls. SNPs allelic and genotype frequencies, summarized in table 2, were in Hardy-Weinberg equilibrium for all groups. No significant difference was found for the SNPs analyzed and demographic population.

When SLE patients and controls were stratified according to gender, we observed associations of SNP rs10259269 between the females (Table 4). The A/A genotype (rs10259269) was significantly less frequent in SLE female patients (0.7%) than female controls (7.6%) providing protection against SLE (OR= 0.09, CI 95%= 0.002- 0.75, p-value= 0.01). No significant differences in genotype and allele frequencies were observed for others tested SNPs, also no was found significantly association for male sex. The SNPs frequencies no were depending of the ethnicity (Table 3).

Statistically significant differences were found for haplotype distribution (Table 5) ($D' = 0.66 - 0.99$) (rs2330875, rs7802995, rs7805969, rs10259269 and rs15866, respectively) TGGTT and TAGTC haplotypes were less frequent in SLE patients (14.67%, 8.42%) than controls (16.09%, 20.41%), respectively, suggesting a role in the protection of SLE development (OR = 0.54, IC=0.32- 0.90, p-value=0.01 and OR = 0.25, IC=0.14- 0.43, p-value=9.04e-08, respectively). Interestingly, after stratification for ethnic group and gender, the TAGTC haplotype was significantly associated to SLE female patients and European-ancestry patients suggested again a protection against the disease development (OR= 0.41, IC= 0.19-0.86, p-value=0.01 and OR= 0.25, IC= 0.13- 0.47, p-value= 2.30e-06, respectively).

The TAGTC haplotype showed lower frequency in female patients and European-derived SLE patients (8.49% and 9.17%) when compared to controls (13.18%, 21.28%), respectively. No difference significant was observed for haplotypes distribution and male cohort and African-ancestry.

No significant differences were found when comparing European-ancestry (patients and controls) or African-ancestry (patients and controls) with the gender, similarly was not observed difference when comparable between male and female adjusted by ethnicity. These results suggest SNPs frequencies were not depending on the gender and ethnicity.

We also analyzed the association between STK17A gene SNPs and clinical/serological manifestations presented by patients (Table 6). A significant association was observed for rs7802995 SNP with the development of the cutaneous manifestation in SLE patients. The A/G (rs7802995) genotype was associated with increased susceptibility (OR = 3.44, CI= 1.37- 9.54, p-value = 0.004). Finally, was observed association of ethnicity with protection of the development of serological manifestations as: Anti DNA (OR=0.11, IC=0.003- 0.74, p-value=0.009) in African-derived patients (Table 7). The clinical manifestations no were dependent from gender (data not shown).

DISCUSSION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial autoimmune disease characterized by various different clinical manifestations and etiology unknown. In recent study, Sandrin-Garcia et al (2009)⁹ analyzed gene expression profile of SLE patients and identified STK17A gene as a possible candidate for susceptibility to disease development. This gene encodes a protein is involved directly in the process of double-stranded breaks DNA repair (DSBs). Some studies have reported the association of functional polymorphisms

in genes that act in this process with the pathogenesis of SLE, beyond the distribution of these markers in different populations, being of great importance for the understanding of the background these factors in susceptibility / protection, manifestation, prognosis or treatment of disease.¹⁷⁻²⁰

To our knowledge, this is the first study to evaluate STK17A gene polymorphisms in SLE patients.

Our results showed an association of the A/A genotype for the SNP rs10259269 after stratification according to gender conferred a protection factor (OR= 0.09) for SLE development in females. It was not observed association in male patients. While the genetic contribution of sexual dimorphism in SLE has not been fully explored. Recently Hughes et al (2011)²¹ reported sex-specific genetic differences in SLE and found association in some locus: gene KIAA1542 (rs4963128) only in female sex, while in the HLA locus (rs3131379 and rs1270942) and in IRF5 (rs2070197) was significantly higher in men than in women. These authors also suggested that the sexual disparities in SLE, either for the fact that the women inherit a smaller number of risk variants for determining susceptibility/ protection of disease than men, given that other factors such as X chromosome and hormonal differences also act favoring frequency of 4-13 women affected for every man affected²². Thus, our data suggests the involvement AA genotype for the SNP (rs10259269) STK17A gene in the protection of women against disease development and no statistically significant correlation in male.

We observed the association of haplotypes TGGTT and TAGTC, formed of the polymorphisms (rs2330875, rs7802995, rs7805969, rs10259269 and rs15866, respectively) in the gene STK17A with protection against the development of SLE (OR = 0.54 and OR = 0.25, respectively). Interestingly, after stratification for sex and ethnicity, the TAGTC

haplotype again conferred protection to the European-ancestry (OR= 0.25) and female (OR = 0.41) against SLE.

The mechanism by which the haplotypes of the STK17A gene predispose or protect against SLE is still unclear. Possibly relates to the cumulative effect of the mutated alleles²³ and the position of tagSNPs in regulatory regions of the STK17A gene, and that in association of the genetics background of some factors as the ethnicity or sex resulting in protective effect against to SLE. Considering that association was not found between alleles and genotypes for SNPs analyzed in SLE patients and after stratification by ethnicity. As is known that SLE is 2-3 times more frequent in African ancestry than European ancestry.²⁴ We suggest the Involvement of TAGTC haplotype in European-ancestry protection against SLE, being also seen the protective effect in females and in SLE patients. However, in this last the haplotype TGGTT was also associated with protection. Others functional studies are needed to evaluate the effect these associated haplotypes and of the polymorphisms in the STK17A gene expression.

Few studies have evaluated the association between DNA repair genes polymorphisms and susceptibility to SLE. BASSI et al (2008)¹⁷ observed an association between: XRCC1 gene (Arg399Gln) and the presence of anti-dsDNA antibody, XRCC3 gene (Thr241Met) and antibody antiphospholipid (APS) and two polymorphic sites with neuropsychiatric manifestations. The authors also showed decrease in the efficiency of DNA repair in SLE patients after irradiation and concluded that SLE patients have a lower efficiency to repair DNA damage and DNA repair genes polymorphisms may predispose to the development of determined clinical features. LIN et al (2009)¹⁸ reported an association between XRCC1Arg399Gln (rs25487) functional polymorphism and susceptibility to SLE development. The authors also observed an association between SLE patients with

heterozygous genotype (XRCC1 Arg/Gln) and photosensitivity, malar rash, hematological disorders, arthritis and antinuclear antibodies. Recently, WARCHOL et al (2012)¹⁹ again confirmed that the polymorphism XRCC1 (Arg399Gln) may increase the risk of developing SLE and also observed an association with clinical manifestations such as malar rash and photosensitivity.

In this study, we also observed association between STK17A gene SNPs and SLE clinical manifestations. The SNP (rs7802995) was associated with the development of the cutaneous manifestation: the A/G (rs7802995) genotypes conferred increase susceptibility (OR = 3.44). Interestingly, SLE patients have sensitivity to UV component of UV light in function of: DNA breaks that will stimulate the production of antibody anti-DNA, stimulate lymphocytes to produce antibodies and no removal of immune complexes from blood circulation, which may be deposited in the tissues causing inflammation. BEZERRA et al (2005)²⁵ and SAUMA et al (2004)²⁶ observed a high incidence of cutaneous manifestations in SLE patients (90.2% and 93.3%, respectively) in Brazil tropical regions, suggesting that the cutaneous manifestations may be closely related to UV light exposure. Thus, we may explain the association of (rs7802995) SNPs with the cutaneous manifestations observed in patients in this study.

When was observed the association of ethnicity with clinical and serological manifestations. African- ancestry patients showed a significant association with protection (OR = 0.11) against the development of serological manifestation anti ds-DNA. The disease is usually more severe in African ancestry than European ancestry. ALARCÓN et al. (2006)²⁷ and BASTIAN et al. (2007)²⁸ observed increased risk for the development of nephritis in SLE patients with African-ancestry than European ancestry, with a probable cause is the production of anti-ds DNA which is deposited preferably in the kidney.²⁹ Surprisingly, the

African ancestry patients conferred protection against development of anti-ds DNA, this data suggests possible involvement of STK17A gene in response to genetic variation in African ancestry protecting against the development of hyper-reactive lymphocytes directed against DNA molecule or increasing the capacity of repair gene STK17A with protective effect against development of anti ds-DNA antibodies in African patients ancestry.

We suggest the acting of the STK17A gene in repair mechanisms of double strand breaks of DNA and similarly as in others studies of repair proteins of DSBs, alteration in this gene was significantly associated to SLE and clinical manifestations. The STK17A gene is integrant of family of DAP-kinases,³⁰ and encodes a nuclear protein which presents an N-terminal catalytic domain and a C-terminal regulatory domain.¹⁰ The underexpression this protein has been association with various types of cancers.³¹⁻³⁴ In addition to its correlation with the regulation of nuclear processes and the reply to the damage of the DNA: positive regulation of apoptotic process,¹⁰ intracellular protein kinase cascade,¹⁰ regulation of reactive oxygen species metabolic process.³⁵ SANJO et al. (1998)¹⁰ by in vitro assay, through mutations induced in catalytic domain of the gene STK17A, at one conserved point responsible for phosphotransferase reaction, resulting in loss of kinase activity. These authors, has suggested that the STK17A can be activated in reply to the external stimuli as radiation UV and certain drugs, in view of that these factors also activate others DAP kinases as CaMKII, which has structural homology in catalytic domain with the STK17A.³⁶ The activity of serine / threonine kinase has been requested by the DNA PKs (DNA dependent protein kinase catalytic subunit) for DNA repair double strand breaks,³⁷ in which this process is essential for the stability of the genomic DNA and in the development of lymphocytes through the antigen receptor gene rearrangement and therefore not specific polyclonal activation of B lymphocytes,³⁸ both mechanisms participate in the pathogenesis of lupus by

the formation of autoantibodies against molecules as DNA. Therefore, we suggests the *STK17A* gene can be linked to the repair of DSBs that through of autophosphorylation capacity inducing a conformational change and facilitating access for processing enzymes for DNA double strand break and that the presence of polymorphisms in this gene may alter the repair of DSBs. However, other studies of replica are needed to assess the functional effect of these SNPs in the expression and / or activity of protein confirming its role in susceptibility / protection to the disease.

Despite not knowing the exact role of the TagSNPs SNPs associated in this study, being them just markers of haploblocks, we believe that genetic defects in *STK17A* gene could be responsible for inefficiency in the repair of double-stranded breaks DNA in SLE patients, which can lead to accumulation of DNA breaks and induce the formation of autoantibodies which will trigger the disease manifestation.

CONCLUSION

This is the first study describing an association between *STK17A* gene SNPs and SLE susceptibility: our results evidence that polymorphisms in this gene are associated with susceptibility/protection factor for the disease development. Moreover, the data observed are in agreement with the results of microarray analysis, which indicated *STK17A* as candidate gene to be involved in the SLE pathogenesis. Additional studies are needed to confirm the involvement of the gene in SLE susceptibility.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledgement the financial support of CNPq (Universal 477914/2010-1) and FACEPE. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for

Health-PDTISFIOCRUZ for the use of its facilities. SC is recipient of a fellowship grant from the European Project “Talents for an International House” within the framework of the 7th Research & Development Framework Programme PEOPLE – Marie Curie Actions – COFUND (Co-Funding of Regional, National and International Programmes).

CONFLICTS OF INTEREST

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WAKELAND EK, LIU K, GRAHAM RR. Delineating the Genetic Basis Review of Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2001 15:397-408.
2. LASKIN CA, HADDAD G & SOLONINKA CA. The regulatory role of NZB T lymphocytes in the production of anti-DNA antibodies in vitro. *J Immunol*. 1986 137(6):1867-1873.
3. KYOGOKU C, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet*. 2004 75: 504-507.
4. LEE YH, HARLEY JB, NATH SK. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet*. 2005 116: 361-367.
5. SIGURDSSON S, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet*. 2005 76: 528-537.
6. WANG SC, et al. Programmed death-1 gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *J Clin Immunol*. 2006 26(6):506-511.
7. REMMERS EF, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *New Eng J Med*. 2007 357: 977-986.
8. KOIKE T. The new era of autoimmune disease research. *Arthritis Res Ther*. 2011 13(3):113.

9. SANDRIN-GARCIA P, et al. Shared and Unique Gene Expression in Systemic Lupus Erythematosus depending on Disease Activity. *Contemporary Challenges in Autoimmunity: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009 1173: 493–500
10. SANJO H, KAWAI T, AKIRA S. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J Biol Chem.* 1998 273: 29066-29071.
11. OHNISHI T, MORI E, TAKAHASHI A. DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutat Res.* 2009 669: 8-12.
12. TAKEDA Y, DYNAN WS. Autoantibodies against DNA double strand break repair proteins [review]. *Front Biosci.* 2001; 6: 1412–22.
13. LEE KJ, et al. Identification of human autoantibodies to the DNA ligase IV/XRCC4 complex and mapping of an autoimmune epitope to a potential regulatory region. *J Immunol.* 2002 169: 3413-3421.
14. VARGAS AE, et al. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res.* 2006 39:321-325.
15. VEIT TD, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009 18(5): 424-30.
16. SAMBROOK J, FRITCH EF, MANIATIS T. *Molecular cloning - A laboratory Manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
17. BASSI C, et al. Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008 17(11): 988-95.
18. LIN YJ, et al. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and associations with systemic lupus erythematosus risk in the Taiwanese Han Chinese population. *Lupus.* 2009 18:1246–1251.
19. WARCHOL T, et al. XRCC1 Arg399Gln gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. *DNA Cell Biol.* 2012 31(1):50-56.
20. A.T. BORCHERS et al. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus *Autoimmunity Reviews.* 2010 (9) 277–287.
21. HUGHES T, et al. Analysis of autosomal genes reveals gene-sex interactions and higher total genetic risk in men with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2011 Nov 21.
22. PETRY M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* vol16, p 847-858,(2002).

23. VYSE, T.J; KOTZ, BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev. Immunol.* 1998, vol.16, pag.261-292.
24. DANCHENKO N, SATIA JA, ANTHONY MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006;15: 308–18.
25. BEZERRA ELM, et al. Systemic Lupus Erythematosus (SLE): Clinical and laboratory profile of patients followed at the onofre lopes university hospital (UFRN-Natal/Brazil) and early organ damage in patients with recently diagnosed disease. *Rev Bras Reumatol.* 2005 45(6): 339-342
26. SAUMA MFLC, NUNES NAC, LOPES LFM. Estudo retrospectivo das manifestações clínicas e laboratoriais de 104 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), em Belém, PA, Brasil (1990-1999). *Rev Bras Reumatol.* 2004 44: 192-197.
27. ALARCÓN GS et al. Time to renal disease and end-stage renal disease in PROFILE: a multiethnic lupus cohort. *PLoS Med* 2006;3:396.
28. BASTIAN HM et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA) XL II: factors predictive of new or worsening proteinuria. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:683–9.
29. MANSON JJ, MA A et al. Relationship between anti-dsDNA, antinucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R154.
30. COHEN O, FEINSTEIN E AND KIMCHI A. DAP-kinase is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *The EMBO Journal* (1997) 16, 998 - 1008 doi:10.1093/emboj/16.5.998.
31. QINGQU GUO, YING CHEN, AND YULIAN WU. Enhancing apoptosis and overcoming resistance of gemcitabine in pancreatic cancer with bortezomib: a role of death-associated protein kinase-related apoptosis-inducing protein kinase 1. *Tumori*, 95: 796-803, 2009.
32. W. YANG et al. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. / *Cancer Letters* 243 (2006) 217–227.
33. GIEFING M et al. Characterization of homozygous deletions in laryngeal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 184 (2008) 38e43.
34. WEI X et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet.* 2011 May; 43(5):442-6. Epub 2011 Apr 15.
35. MAO P. Serine/Threonine Kinase 17A Is a Novel p53 Target Gene and Modulator of Cisplatin Toxicity and Reactive Oxygen Species in Testicular Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2011 Jun 3; 286(22):19381-91.

36. WRIGHT SC et al. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates signal transduction in apoptosis. *The FASEB Journal*. 1997. Vol. 11, 843-849.
37. DING Q et al. Autophosphorylation of the Catalytic Subunit of the DNA-Dependent Protein Kinase Is Required for Efficient End Processing during DNA Double-Strand Break Repair. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 2003, Vol. 23(16), p. 5836–5848.
38. FERREIRA C et al. Instability of natural antibody repertoires in Systemic lupus Erythematosus patients, revealed by Multiparametric Analysis of Serum Antibody reactivities. *Scand J Immunol*.1997. 45, 331-341

Table 1. Clinical and demographical characteristics of the 143 studied Brazilian SLE patients.

Demografic and Clinical\ laboratories characteristics	SLE Patients n (%)
Sex	
Male	8 (5.6%)
Female	135 (94.4%)
Ethnic Group	
European derived	113 (79%)
African derived	30 (21%)
Clinical\Laboratories Characteristics	
Photosensitivity	42 (29.4%)
Serositis	36 (25.2%)
Arthritis	61 (42.6%)
Cutaneous alterations	84 (58.7%)
Neuropsychiatric disorder	29 (20.3%)
Nephritic disorder	80 (55.9%)
Hypertension Arterial Syndrome	47 (32.9%)
Hematological alterations	80 (55.9%)
Immunological alterations	87 (60.8%)
Antinuclear Factor positive (FAN)	115 (80.4%)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	28 (19.6%)
Antiohospholipid syndrome (APS)	30 (21%)
Sjögren syndrome	4 (2.8%)
Raynaud phenomenon	7 (4.9%)

Table 2. Allele and genotype frequencies of STK17A associated SNPs in SLE patients and healthy controls before and after stratification.

FÊMEAS			
rs10259269	Patients n=135 (%)	Controls n=79 (%)	OR, CI and p-values
Alleles			
T	231 (85.6)	123 (77.8)	OR = 1
A	39 (14.4)	35 (22.2)	OR = 0.59, CI = 0.34- 1.02, p = 0.05
Genotypes			
T/T	97 (71.9)	50 (63.3)	OR = 1
T/A	37 (27.4)	23 (29.1)	OR = 0.83, CI= 0.43- 1.63, p-value = 0.63
A/A	1 (0.7)	6 (7.6)	OR = 0.09, CI= 0.002- 0.75, p-value = 0.01

Table 3. Associated haplotypes of STK17A (rs2330875-rs7802995-rs7805969-rs10259269-15866) SNPs in SLE patients and healthy controls before and after stratification for ethnic group and sex

	Haplotypes	Patients n (%)	Controls n (%)	OR, CI and p-value
Total	TAATC	124 (43.32)	91 (25.77)	OR=1
	TGGTT	42 (14.67)	57 (16.09)	OR=0.54, IC=0.32- 0.90, p-value=0.01
	TAGTC	24 (8.42)	72 (20.41)	OR= 0.25, IC=0.14- 0.43, p-value=9.04e-08
	AAGAT	31 (10.75)	43 (12.24)	OR= 0.53, IC=0.3- 0.93, p-value=0.02
Female	TAATC	116 (42.90)	43 (27.44)	OR=1
	TGGTT	40 (14.75)	19(12.36)	OR=0.78, CI= 0.39-1.59, p-value=0.50
	AAGAT	26 (9.80)	20 (12.87)	OR= 0.48, IC= 0.23- 1.01; p-value=0.04
	TAGTC	23 (8.49)	21 (13.18)	OR= 0.41, IC= 0 .19- 0.86; p-value=0.01
European- derived	TAATC	97 (42.92)	65 (24.94)	OR=1
	TGGTT	37 (16.36)	44 (16.99)	OR= 0.56, IC= 0.32- 1.00, p-value= 0.04
	TAGTC	21 (9.17)	56 (21.28)	OR= 0.25, IC= 0.13- 0.47, p-value= 2.30e-06
	AAGAT	19 (8.55)	28 (10.84)	OR= 0.46,.IC= 0.22- 0.93, p-value= 0.02
African- derived	TAATC	26 (42.75)	27 (28.99)	OR=1
	TAGTC	4 (7.20)	16(7.24)	OR= 0.26, IC= 0.06- 0.97; p-value = 0.03
OR = odds ratio. CI = 95% confidence interval. *statistically significant p value				

Table 4. SLE patients clinical manifestation (%) accordingly to STK17A gene SNPs associated genotype

STK17A SNPs									
Clinical \ Laboratories Characteristics	rs7802995 n (%)			rs7805969 n (%)			rs15866 n (%)		
Genotypes	AA	AG	GG	GG	AG	AA	CC	CT	TT
Photosensitivity	28 (27.5)	13 (34.2)	1 (33.3)	14 (35)	21 (26.2)	7 (30.4)	15 (34.9)	20 (26.7)	7 (28)
Serositis	24 (23.5)	11 (28.9)	1 (33.3)	14 (35)	17 (21.3)	5 (21.7)	11 (25.6)	15 (20)	10 (40)
Arthritis	48 (47.1)	12 (31.6)	1 (33.3)	13 (32.5)	39 (48.8)	9 (39.1)	20 (46.5)	36 (48)	5 (20)
Cutaneous alterations	53 (52)	30 (78.9)[#]	1 (33.3)	29 (72.5)	45 (56.3)	10 (43.5)	19 (44.2)	49 (65.3)	16 (64)
Neuropsychiatric disorder	25 (24.5)	4 (10.5)	0 (0)	9 (22.5)	14 (17.5)	6 (26.1)	10 (23.3)	15 (20)	4 (16)
Nephritic disorder	56 (54.9)	23 (60.5)	1 (33.3)	27 (67.5)	41 (51.3)	12 (52.2)	23 (53.5)	40 (53.3)	17 (68)
Hypertension Arterial Syndrome	29 (28.4)	17 (44.7)	1 (33.3)	16 (40)	26 (32.5)	5 (21.7)	12 (27.9)	25 (33.3)	10 (40)
Hematological alterations	58 (56.9)	20 (52.6)	2 (66.7)	24 (60)	44 (55)	12 (52.2)	25 (58.1)	42 (56)	13 (52)
Immunological alterations	61 (59.8)	24 (63.2)	2 (66.7)	28 (70)	44 (55)	15 (65.2)	24 (55.8)	46 (61.3)	17 (68)
Antinuclear Factor positive (FAN)	80 (78.4)	33 (86.8)	2 (66.7)	34 (85)	61 (76.3)	20 (87)	37 (86)	57 (76)	21(84)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	22 (21.6)	5 (13.2)	1 (33.3)	7 (17.5)	14 (17.5)	7 (30.4)	12 (27.9)	13(17.3)	3 (12)
Antiohospholipid syndrome (APS)	22 (21.6)	8 (21.1)	0 (0)	9 (22.5)	16 (20)	5 (21.7)	8 (18.6)	16 (21.3)	6 (24)
Sjögren syndrome	0 (0)	2 (5.3)	2 (2)	1 (2.5)	3 (3.8)	0 (0)	0 (0)	3 (4)	1 (4)
Raynaud phenomenon	5 (4.9)	2 (5.3)	0 (0)	3 (7.5)	2 (2.5)	2 (8.7)	1 (2.3)	5 (6.7)	1 (4)

[#] OR= 3.44. CI= 1.37-9.54. **p-value = 0.004.**

Table 5 Clinical manifestations associated for stratification according to ethnicity.

Clinical\Laboratories Characteristics	Ethnic group		Sex	
	European n=113 (%)	African n=30 (%)	Female n=135	Male n=8
Photosensitivity	38 (33.6)	4 (13.3)	41 (30,4)	1 (12,5)
Serositis	32 (28.3)	4 (13.3)	33 (24,4)	3 (37,5)
Arthritis	51 (45.1)	10 (33.3)	57 (42,2)	4 (50)
Cutaneous alterations	71 (62.8)	13(43.3)	78 (57,8)	6 (75)
Neuropsychiatric disorder	25 (22.1)	4 (13.3)	28 (20,7)	1 (12,5)
Nephritic disorder	62 (54.9)	18 (60)	75 (55,6)	5 (62,5)
Hypertension Arterial Syndrome	37 (32.7)	10 (33.3)	44 (32,6)	3 (37,5)
Hematological alterations	69 (61.1)	11 (36.7)	74 (54,8)	6 (75)
Immunological alterations	68 (60.2)	19 (63.3)	83 (61,5)	4 (50)
Antinuclear Factor positive (FAN)	95 (84.1)	20 (66.7)	110(81,5)	5 (62,5)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	27 (23.9)	1 (3.3)*	28 (20,7)	0 (0)
Antiohospholipid syndrome (APS)	21 (18.6)	9 (30)	30 (22,2)	0 (0)
Sjögren syndrome	4 (3.5)	0 (0)	4 (3)	0 (0)
Raynaud phenomenon	6 (5.3)	1 (3.3)	6 (4,4)	1 (12,5)
*OR=0.11, IC=0.003- 0.74, p-value=0.009.				

